

Université de Sherbrooke

**Approches employées pour mieux comprendre les fonctions du complexe
Yku et de la télomérase chez la levure
*Saccharomyces cerevisiae***

Par

Mélissa Ricard

Département de Microbiologie et Infectiologie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des Sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M.Sc.) en Microbiologie

Septembre 2005



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-17353-4

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-17353-4

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ILLUSTRATIONS	III
LISTE DES SIGLES, ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES	VI
RÉSUMÉ	
I. INTRODUCTION	1
LES TÉLOMÈRES	1
<i>LA STRUCTURE DES TÉLOMÈRES</i>	3
<i>LES FONCTIONS EXERCÉES PAR LES TÉLOMÈRES</i>	7
<i>La protection des chromosomes</i>	8
<i>Le silencing transcriptionnel</i>	10
<i>La réplication complète des chromosomes</i>	15
La télomérase de <i>S. cerevisiae</i>	17
<i>EST1, EST2, EST3, EST4/CDC13</i>	19
Yku et les protéines Sm	21
La composante ARN de la télomérase, <i>TLC1</i>	22
La régulation de la télomérase	26
La télomérase humaine	27
<i>YKU : UNE PROTÉINE MULTIFONCTIONNELLE</i>	29
<i>La structure de Yku</i>	30
<i>Les fonctions de Yku</i>	31
DOUBLE / TRIPLE-HYBRIDE	32

<i>LE SYSTÈME DOUBLE-HYBRIDE</i>	32
<i>LE SYSTÈME TRIPLE-HYBRIDE</i>	33
OBJECTIFS	34
II. MATÉRIEL ET MÉTHODES	35
III. RÉSULTATS	63
IV. DISCUSSION ET CONCLUSIONS	102
V. REMERCIEMENTS	112
VI. LISTE DES RÉFÉRENCES	113

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Tableau 1. <i>Répétitions télomériques de certains organismes</i>	4
Figure 1. <i>Structure générale d'un télomère de S. cerevisiae</i>	7
Figure 2. <i>Structure secondaire de l'ARN de la télomérase de levure</i>	25
Figure 3. <i>Constructions plasmidiques</i>	41
Tableau 2. <i>Souches utilisées pour les criblages double et triple-hybride, l'étude des fonctions de Yku et les essais de complémentation</i>	47
Tableau 3. <i>Sondes utilisées pour les buvardages de type Southern</i>	54
Figure 4. <i>Stratégie utilisée pour la détection de protéines interagissant avec le complexe Yku</i>	58
Figure 5. <i>Stratégie utilisée pour l'identification d'autres partenaires de l'ARN de la télomérase de levure</i>	59
Tableau 4. <i>Oligonucléotides utilisés pour les constructions, les délétions, le séquençage et l'hybridation in-gel</i>	62

Figure 6. Comparaison des phénotypes télomériques d'une souche yku ⁻ avec une souche de type sauvage	64
Figure 7. Validation des constructions utilisées dans le criblage double-hybride par tests de complémentation et immunobuvardage	65
Figure 8. Représentation schématique des contrôles du criblage double-hybride	70
Figure 9. Croissance des contrôles du criblage double-hybride sur milieux sélectifs	71
Figure 10. Étapes suivies lors du criblage double-hybride	73
Tableau 5. Progression du criblage, par double-hybride, des partenaires d'interaction de Yku	74
Figure 11. Exemple d'un clone montrant une interaction avec Yku : le clone C3BD70-21	75
Figure 12. Stratégie employée pour analyser les fonctions des sous-unités de Yku aux télomères	77

Figure 13. <i>TPE exercé par les sous-unités de l'hétérodimère Yku ciblées à un télomère particulier</i>	81
Figure 14. <i>Phénotypes télomériques observés lorsque les sous-unités de Yku sont ciblées à un télomère particulier</i>	84
Figure 15. <i>Validation des constructions utilisées dans le criblage triple-hybride par tests de complémentation et immunobuvardage</i>	91
Figure 16. <i>Représentation schématique des contrôles du criblage triple-hybride</i>	93
Figure 17. <i>Croissance des contrôles du criblage triple-hybride sur milieux sélectifs</i>	95
Figure 18. <i>Étapes suivies lors du criblage triple-hybride</i>	98
Tableau 6. <i>Progression de la première partie du criblage, par triple-hybride, des partenaires d'interaction de l'ARN de la télomérase de levure</i>	99
Figure 19. <i>Exemple de clones montrant une interaction avec TLC1</i>	100
Tableau 7. <i>Identité des protéines montrant une interaction avec TLC1</i>	101

LISTE DES SIGLES, ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

3' : extrémité 3' d'un nt, groupe OH libre sur le carbone 3' du sucre

3-AT : 3-Amino-1,2,4-triazol

5' : extrémité 5' d'un nt, groupe OH libre ou ester phosphate sur le carbone 5' du sucre

5-FOA : acide 5-fluororotique (Bioshop)

A : adénosine

a.a. : acide aminé

AD : « activation domain » ou domaine d'activation de la transcription

Ade : adénine

ADN ou DNA : acide désoxyribonucléique

ADNg : ADN génomique

ARN ou RNA : acide ribonucléique

ATP : adénosine-5'-triphosphate

BD : « binding domain » ou domaine de liaison à l'ADN

C: cytosine

°C : degré Celcius

CDB : cassures double-brin de l'ADN

CIAP : « Calf Intestinal Alkaline Phosphatase »

Ci : Curie

ChIP : « chromatin immunoprecipitation » ou immunoprécipitation de la chromatine

Chr. : chromosome

cm² : centimètre carré, unité de mesure d'une surface

C-terminal(e) : carboxy-terminal(e)

ctrl : contrôle

db : double-brin

dCTP: didéoxy cytosine-5'-triphosphate

D.O. : densité optique

DTT : dithiothréitol

Drop-out mix : mélange d'acides aminés (9.4%(p/p) acide aspartique, 9.4% cystéine, 7.5% isoleucine, 1.9% méthionine, 4.7% phénylalanine, 4.7% proline, 37.7% sérine, 18.9% thréonine, 5.7% tyrosine)

EDTA : tétraacétate d'éthylènediamine disodium

EST : « Ever Shorter Telomeres »

EtBr : bromure d'éthidium

G : guanosine

G418 : geneticin (GibcoBRL 11811-023)

Gén.: génération

His ou H : histidine

Ig: immunoglobuline

kb : kilobase

kDa : kiloDalton

kpb : kilopaire de bases

Leu ou L : leucine

LB : milieu « Luria Broth » (0.5% Yeast Extract, 1% Tryptone, 1% NaCl)

M : molaire

M9 : 42.3 mM Na₂HPO₄, 22 mM KH₂PO₄, 8.6 mM NaCl, 18.7 mM NH₄Cl, 2mM MgSO₄, 0.1mM CaCl₂, 2% glucose, 1.5% agar, 40µg/ml d'acide aminé (Leucine, Tryptophane et/ou Uracile)

Magic buffer (10X): 0.2M Tris pH7.2, 0.7M NaCl, 0.2M KCl, 0.1M MgCl₂, 0.5mM Spermine, 0.125mM Spermidine, 0.1% Aprotinin

µg : microgramme

min : minute

µl : microlitre

ml : millilitre

µM : micromolaire

mM : millimolaire

mmol : millimole

nm : nanomètre

NaCl : chlorure de sodium

NaOH : hydroxide de sodium

NHEJ : « non-homologous end-joining »

nM: nanomolaire

nt : nucléotide

ORF : « Open Reading Frame »

pb : paire de bases

PBS : « phosphate-buffered saline » (1X : 136.9 mM NaCl, 1.8 mM KH_2PO_4 , 10.1 mM Na_2HPO_4 , pH 7.4)

PBST : « phosphate-buffered saline » 0,1% Tween 20

PCR : « polymerase chain reaction »

pH : mesure de l'acidité

pmol : picomole

PVDF : polyvinylidene difluoride

RNAse : enzyme dégradant l'ARN

rpm : révolution par minute

sb : simple-brin

SDS : sodium dodecyl sulfate

ser : sérine

snoRNP : « small nucleolar ribonucleoprotein » ou petite ribonucléoprotéine nucléolaire

T : thymidine

T4 PNK : « T4 Polynuclease kinase »

TBE : 40 mM Tris-Borate, 1 mM EDTA

TCA : Acide trichlororique

TE : 10mM Tris, 1mM EDTA pH 8,0

thréo : thréonine

TPE : « telomere position effect »

TRF: « terminal restriction fragment » ou fragment terminal de restriction

Trp ou T: tryptophane

UAS : « upstream activating sequence »

Ura ou U : uracile

V : volt

WT : « wild type » ou type sauvage

YC : milieu « Yeast Synthetic Complete » (0.17% YNB, 2% Glucose, 0.1%

Acide L-glutamique, 1.2g/L Drop-out mix, pH 6.0)

YEPD : milieu « Yeast Extract Peptone D-glucose » (1% Yeast Extract, 1%

Peptone, 2% Glucose, 0.01% Adénine)

YNB : Yeast Nitrogen Base (sans a.a.)

Université de Sherbrooke

**Approches employées pour mieux comprendre les fonctions du
complexe Yku et de la télomérase chez la levure**

Saccharomyces cerevisiae

Mélissa Ricard

Département de Microbiologie et Infectiologie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des Sciences de la santé en
vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc) en Microbiologie

Septembre 2005

Mots-clés : télomérase, TLC1, Yku, interactions protéiques, criblages
double- et triple-hybride.

RÉSUMÉ

Les télomères sont les structures nucléoprotéiques retrouvées à l'extrémité des chromosomes eucaryotes. L'ADN télomérique est généralement constitué de courtes séquences répétées et régulières. Chez la levure *S. cerevisiae*, les télomères ont approximativement 300 pb de séquences répétées et dégénérées, (TG)₁₋₆TG₂₋₃. De plus, les télomères présentent une extension 3' simple-brin de 12-14 nt ou 30 nt selon la phase du cycle cellulaire et comportent plusieurs protéines, dont l'hétérodimère Yku. Les télomères exercent plusieurs fonctions au sein de la cellule, notamment

celle de permettre la réplication complète des chromosomes grâce à la télomérase. Dans cette étude, nous avons entamés, ou encore achevés, certains criblages ayant pour but d'identifier de nouvelles protéines télomériques, faisant partie de la télomérase ou encore impliquées dans la fonctionnalité de sa composante ARN. De plus, nous avons étudié les fonctions des sous-unités de l'hétérodimère Yku. Il nous a alors été impossible d'identifier de nouveaux partenaires de l'hétérodimère Yku par double-hybride. L'étude de fonctions potentiellement exercées indépendamment par les sous-unités du complexe Yku, nous a ensuite permis de conclure que la formation de l'hétérodimère Yku serait requise pour que ce dernier exerce ses fonctions télomériques. Puis, par triple-hybride, nous avons identifié trois candidats qui pourraient s'avérer être de nouveaux partenaires de l'ARN TLC1, soient *NST1*, *SPP381* et *ARK2*. Or, une analyse plus approfondie de ces derniers sera nécessaire pour en arriver à établir un lien concret entre ces protéines et l'ARN de la télomérase. Finalement, il s'avère que le système triple-hybride pourrait être fort utile pour l'étude du pseudo-nœud proposé par Dandjinou *et al.*, 2004 entre les hélices V et VI de l'ARN TLC1.

I. INTRODUCTION

LES TÉLOMÈRES

Les organismes procaryotes sont, en majorité, des organismes possédant des chromosomes circulaires. Cependant, afin d'acquérir une plus grande diversité, l'évolution a poussé les organismes à acquérir un génome linéaire, comme c'est le cas pour les eucaryotes. Cette linéarité pose toutefois un problème, puisqu'il entraîne la présence d'extrémités chromosomiques ayant, à première vue, l'apparence de cassures double-brin de l'ADN. Or, contrairement à ces dernières, les extrémités chromosomiques sont stables et ne sont pas sujettes à des événements de réparation.

C'est à la fin des années 1930, avant même la découverte de l'ADN, qu'Hermann J. Muller et Barbara McClintock ont proposé l'idée que la fin des chromosomes devait être une structure spéciale. Lors de l'étude du comportement des chromosomes de *Drosophila* suite à une irradiation aux rayons X, H. Muller constata qu'il était incapable d'obtenir des progénitures ayant chromosomes aux extrémités délétées ou inversées, alors qu'il en obtenait ayant des chromosomes comportant des inversions, translocations et délétions internes chez les insectes non-irradiés. Il proposa alors que la fin

des chromosomes devait être une structure spéciale qu'il appela télomère. Il proposa aussi que celui-ci doive être présent à la fin du chromosome pour être fonctionnel et ainsi occuper une fonction essentielle pour l'intégrité de ce dernier (Muller, 1938).

À cette même époque, B. McClintock étudia l'évolution des chromosomes brisés chez le maïs. Elle constata que, dans certains tissus, les chromosomes brisés fusionnaient bout à bout avec leur chromatide sœur, menant à la formation de chromosomes dicentriques. Ces chromosomes se diviseront asymétriquement lors de la division cellulaire, menant à la perte d'une portion de chromosome chez une des cellules filles, alors que dans l'autre cellule on retrouvera plutôt une duplication de cette même portion. Elle conclut alors que le télomère était essentiel pour empêcher la fusion des chromosomes homologues entre eux (McClintock, 1939; McClintock, 1941).

Par la suite, d'autres études ont montré que les chromosomes brisés étaient aussi instables chez la levure et d'autres organismes. Ces études ont alors confirmé les découvertes faites par Muller et McClintock, qui suggéraient que les fonctions des télomères seraient conservées d'une espèce à l'autre [revue dans (Zakian, 1996)] .

LA STRUCTURE DES TÉLOMÈRES

Des analyses moléculaires, réalisées d'abord chez les ciliés (Blackburn et Gall, 1978; Klobutcher *et al.*, 1981) et ensuite chez plusieurs eucaryotes [revue dans (Zakian, 1989)], ont démontré que les télomères étaient des structures nucléoprotéiques retrouvées aux extrémités des chromosomes. Ceci implique donc qu'ils sont constitués, à la fois d'ADN et de protéines. Chez la plupart des organismes, les télomères sont constitués de courtes répétitions en tandem d'ADN double-brin suivies d'une portion simple-brin dont la séquence, allant du centromère vers l'extrémité 3', est riche en guanines. Ce brin est appelé le brin G-riche, alors que son brin complémentaire, au niveau de la région double-brin, est appelé le brin C-riche. Les répétitions télomériques varient en séquence et en longueur d'une espèce à l'autre (Tableau 1), et peuvent même varier en longueur au sein d'un même organisme. C'est pourquoi ils auront une taille hétérogène lors de leur analyse.

D'une longueur approximative de 250 à 300 pb chez *S. cerevisiae*, les télomères sont constitués de séquences dégénérées répétées $(TG)_{1-6}TG_{2-3}$ (communément appelées TG_{1-3}) (Shampay *et al.*, 1984). Les télomères possèdent, au niveau du brin G-riche, une extension 3' simple-brin d'une longueur variant au cours du cycle cellulaire. Chez la levure, cette extension aurait 30 nucléotides lors de la phase S (Wellinger *et al.*, 1993b) (Figure 1).

Alors que plus récemment, de nouvelles techniques ont permis de déterminer qu'une extension de 12 à 14 nucléotides était présente dans les autres phases du cycle cellulaire (Larrivee *et al.*, 2004).

Tableau 1. Répétitions télomériques de certains organismes

Organismes	Séquences répétées	Références
Champignons		
<i>Saccharomyces</i>	(TG) ₁₋₆ TG ₂₋₃	(Shampay <i>et al.</i> , 1984)
<i>Schyzosaccharomyces</i>	T ₁₋₂ ACA ₀₋₁ C ₀₋₁ G ₁₋₆	(Sugawara, N. et Szostak, J.W., 1986)
Protozoaires		
<i>Tetrahymena</i>	T ₂ G ₄	(Blackburn, E.H. et Gall, J.G., 1978)
<i>Euplotes</i>	T ₄ G ₄	(Klobutcher, L.A. <i>et al.</i> , 1981)
<i>Trypanosoma</i>	T ₂ AG ₃	(Blackburn, E.H. et Challoner, P.B., 1984) (Van der Ploeg, L.H. <i>et al.</i> , 1984)
Plantes		
<i>Arabidopsis</i>	T ₃ AG ₃	(Richards, E.J. et Ausubel, F.M., 1988)
Vertébrés		
<i>Homo sapiens</i>	T ₂ AG ₃	(Moyzis, R.K. <i>et al.</i> , 1988)

Chez l'humain, les télomères sont beaucoup plus longs, soit de 5 à 15 kb de répétitions télomériques TTAGGG (appelées T₂AG₃) et possèdent une extension du brin G-riche allant de 50 à 150 pb présente tout au long du cycle cellulaire (Makarov *et al.*, 1997; McElligott et Wellinger, 1997; Wright, W. E. *et al.*, 1997). Il semble que les extensions 3' simple-brin pourraient être créées par les composantes du complexe MRX. Des études ont démontré que ce complexe occupait une fonction importante dans le maintien de la longueur des télomères chez plusieurs organismes (D'Amours et Jackson, 2002; Haber, 1998). Le complexe MRX est formé des protéines Mre11p, Rad50p et

Xrs2p et est reconnu pour agir à titre de nucléase dans certaines conditions (D'Amours et Jackson, 2002). En absence d'une de ces trois protéines, les cellules seront viables, mais leur télomères seront courts (Boulton et Jackson, 1998; Kironmai et Muniyappa, 1997). De plus, le complexe MRX est nécessaire pour la formation du brin G-riche télomérique et l'assemblage des protéines liant les queues G-riches (Diede et Gottschling, 2001). Récemment, il fût démontré que Mre11p serait importante pour la génération des extensions simple-brin au niveau du brin G-riche (Larrivee *et al.*, 2004).

Les télomères comportent deux régions principales, soient la région télomérique terminale (allant de la région sous-télomérique à l'extrémité du chromosome) et la région sous-télomérique (adjacente à la région terminale vers le centromère). Chez la levure, cette dernière est composée de séquences répétées, nommées les TAS (telomere-associated sequences), qui comportent des éléments répétés, dont les éléments Y' (Henderson, 1995; Pryde *et al.*, 1997). Ceux-ci sont constitués de séquences hautement conservées formant deux classes d'éléments Y', soient la classe majeure (6.7kb) et la classe mineure (5.2 kb), et sont présents au niveau du 2/3 des chromosomes (Chan et Tye, 1983a; Chan et Tye, 1983b; Louis et Haber, 1992; Walmsley *et al.*, 1984). Ils peuvent être retrouvées en plusieurs copies allant de une à quatre. Celles-ci seront toujours orientées dans la même direction les unes par rapport aux autres et seront séparées par des petites séquences d'ADN télomérique TG₁₋₃. Chaque élément Y' contient un ARS

(autonomously replicating sequence) et se réplique à la fin de la phase S, plutôt qu'au début de la phase S comme pour la plupart des ARS (Raghuraman *et al.*, 2001; Reynolds *et al.*, 1989). Le second type d'élément sous-télomérique, est l'élément X. Cet élément est beaucoup moins conservé et on le retrouve annexé du côté centromérique de l'élément Y' lorsque ce dernier est présent, sinon il sera directement juxtaposé aux répétitions télomériques. Le seul élément présent au niveau de tous les télomères de la levure *S. cerevisiae* est l'élément « noyau X ». Le rôle des TAS demeure obscur. Certains chromosomes de levures sont dépourvus de région X ou Y' et demeurent tout de même aptes à se répliquer et à ségréger normalement, indiquant que ces régions n'ont pas de fonctions essentielles (Zakian et Blanton, 1988). Cependant, les éléments Y' peuvent être dispersés d'un télomère à l'autre par recombinaison homologue (Dunn *et al.*, 1984; Louis et Haber, 1990). Ils semblent alors impliqués dans le maintien de la fonction des télomères et de la viabilité cellulaire lorsque la réplication des télomères ne peut se faire adéquatement (Lundblad et Blackburn, 1993). La figure 1 schématise la structure générale d'un télomère de *S. cerevisiae*. Il est à noter qu'au niveau de l'élément Y' est retrouvé le site de restriction pour l'enzyme *XhoI* qui permettra le relâchement d'un TRF (terminal restriction fragment) observable lors d'analyses biomoléculaires (Louis et Haber, 1990).

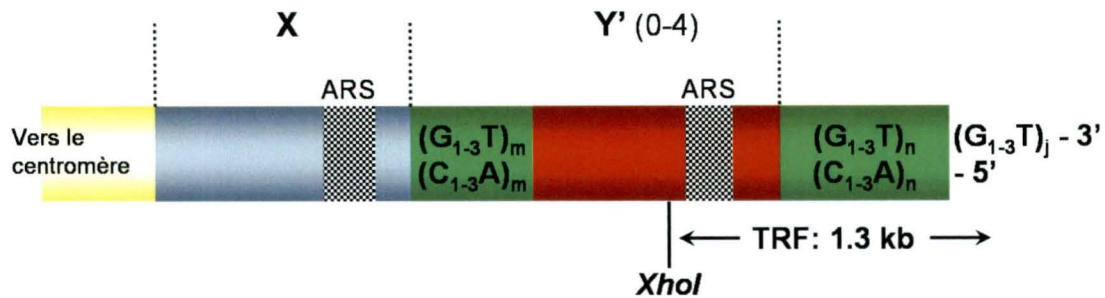


Figure 1. Structure générale d'un télomère de *S. cerevisiae*.

Les télomères retrouvés à l'extrémité des chromosomes se terminent par 300 ± 75 pb de répétitions télomériques $C_{1-3}A/TG_{1-3}$. Ils possèdent généralement des éléments sous-télomériques X et Y'. On retrouve le site de restriction pour l'enzyme *XhoI* au niveau de l'élément Y' lorsque celui-ci est présent. Voir la description dans le texte. Cette figure n'est pas à l'échelle.

LES FONCTIONS EXERCÉES PAR LES TÉLOMÈRES

Les télomères occupent plusieurs fonctions au sein de la cellule. Tout d'abord, ils assurent l'intégrité des chromosomes, entre autre, en permettant la discrimination de leurs extrémités comme cassures double-brin de l'ADN, les protégeant alors contre les fusions entre chromosomes, les événements de recombinaison et la dégradation par les exonucléases (Blasco *et al.*, 1997; Sandell et Zakian, 1993; van Steensel *et al.*, 1998; Zakian, 1995). De plus, les télomères permettent la réplication complète des chromosomes, empêchant ainsi la perte d'information génétique graduelle au fil des générations, et ce, grâce, entre autre, à la télomérase. Chez certains organismes, la transcription des gènes situés à proximité des télomères est réprimée, phénomène appelé « telomere position effect » (TPE), suggérant que les télomères jouent aussi un rôle dans le contrôle de l'expression génique (Gottschling *et al.*, 1990).

Finalement, les télomères sont aussi impliqués dans la localisation nucléaire des chromosomes et seront nécessaires pour la ségrégation de chromosomes lors de la méiose.

La protection des chromosomes

Muller et McClintock ont établi, lors de leurs études, que les télomères assuraient l'intégrité des chromosomes et empêchaient les fusions entre chromosomes de se produire. Des années plus tard, les détails moléculaires du métabolisme de l'ADN furent connus et de nouvelles fonctions ont alors été attribuées aux télomères. La découverte des nucléases a mené à la réalisation que les télomères devaient aussi être nécessaires pour la protection des chromosomes contre la dégradation dans la cellule [revue dans (Zakian, 1996)]. Le capuchon télomérique dissimule alors l'ADN terminal de l'action des nucléases, mais aussi des activités de réparation de l'ADN qui autrement pourraient reconnaître ces extrémités comme des cassures double-brin de l'ADN et engendrer des fusions entre chromosomes ou un signal d'arrêt du cycle cellulaire (médié par *RAD9*) (Sandell et Zakian, 1993).

Il existe deux mécanismes de réparation majeurs des cassures double-brin de l'ADN : la recombinaison homologue et le NHEJ (non-homologous end-joining). Chez les mammifères, la réparation de telles cassures dans l'ADN sera majoritairement effectuée via le NHEJ. Alors que chez *S.*

cerevisiae, la recombinaison homologue sera le mécanisme le plus fréquemment utilisé (Friedberg *et al.*, 1995). Plusieurs protéines sont impliquées dans le NHEJ chez *S. cerevisiae*, dont notamment : Lig4p, Rad50p, Mre11p, Xrs2p, Sir2p, Sir3p, Sir4p et l'hétérodimère Yku (Boulton et Jackson, 1996a; Boulton et Jackson, 1996b; Boulton et Jackson, 1998; Milne *et al.*, 1996; Schar *et al.*, 1997; Tsukamoto *et al.*, 1997). Il sera question plus loin de plusieurs de ces protéines.

Le rôle protecteur des télomères est assuré notamment par la combinaison des protéines liant l'ADN double-brin et/ou simple-brin télomérique, mais aussi par la structure arborée par ces extrémités. Chez la levure, une de ces protéines est Cdc13p, le produit du gène *CDC13*. Son rôle essentiel dans la protection des télomères fût établi lors de l'utilisation d'un allèle thermosensible *cdc13-1*. Cet allèle a la particularité de provoquer l'arrêt du cycle cellulaire (Rad9p dépendant) en phase G2 lorsque les cellules sont cultivées à 28°C, c'est-à-dire à température restrictive. Les souches portant l'allèle *cdc13-1* montrent aussi une grande accumulation d'ADN simple-brin à la fin des chromosomes résultant de la dégradation de plusieurs kilobases du brin C-riche au niveau du télomère. Cdc13p est alors nécessaire pour assurer la protection des télomères contre leur dégradation (Garvik *et al.*, 1995). Il fût par la suite démontré que cette protéine lie l'ADN simple-brin télomérique (Bourns *et al.*, 1998; Lin, J. J. et Zakian, 1996; Nugent *et al.*, 1996) et régule la réplication des télomères. Cdc13p, en collaboration avec Stn1p et Ten1p,

formeraient ce qu'on appelle le capuchon télomérique servant à protéger la fin des chromosomes, ainsi qu'à réguler l'accès des télomères à la télomérase. L'interaction entre ces protéines fût observée *in vivo* et/ou démontrée par double-hybride. *STN1* encode pour Stn1p, une protéine essentielle impliquée dans la protection de la fin des chromosomes, puisque les phénotypes observés pour l'allèle *cdc13-1* sont les mêmes que ceux des cellules dépourvues de Stn1p. Cette protéine limiterait aussi le recrutement de la télomérase aux télomères. *TEN1* est un gène essentiel encodant pour une protéine dont les fonctions demeurent toujours incertaines, mais elle semblerait impliquée elle aussi dans la protection des télomères puisque des mutations dans *TEN1* provoqueraient des arrêts du cycle cellulaire en phase G2/M (Grandin *et al.*, 2001; Grandin *et al.*, 1997). Il sera question ultérieurement du rôle de Cdc13p dans la régulation de la télomérase.

Le silencing transcriptionnel

L'ADN des eucaryotes est compacté en chromatine dont le premier niveau de formation est celui des nucléosomes. Ils sont composés d'un noyau protéique contenant les histones H2A, H2B, H3 et H4 autour duquel est enroulé l'ADN. Il existe plusieurs types de chromatine, dont la chromatine silencieuse, appelée aussi hétérochromatine (Richmond et Widom, 2000; Will et Luhrmann, 2001). Cette chromatine est une structure spécialisée réfractaire à la transcription, ainsi qu'à la recombinaison. Elle se réplique tardivement et

est retrouvée au niveau des régions centromériques et télomériques, où elle joue des rôles cruciaux dans la structure et la ségrégation des chromosomes (Grewal et Elgin, 2002; Karpen et Allshire, 1997). Ce type de chromatine est trouvé au niveau de trois loci chez *S. cerevisiae*, dont les cassettes de mating type silencieux (*HML* et *HMR*), les télomères, ainsi qu'au niveau du locus du gène de l'ARNr (Bryk *et al.*, 1997; Gottschling *et al.*, 1990; Herskowitz, 1992; Smith et Boeke, 1997).

Au niveau des télomères chez *S. cerevisiae*, des études ont démontré qu'au sein des séquences C₁₋₃A/TG₁₋₃, la structure retrouvée était dépourvue de nucléosomes, structure appelée télosome (Wright, J. H. *et al.*, 1992). Les télosomes sont différents des nucléosomes, notamment par le fait que les séquences télomériques seront plutôt liées par la protéine Rap1p que par des histones (Conrad *et al.*, 1990; Strahl-Bolsinger *et al.*, 1997). Rap1p lie l'ADN double-brin dont la séquence consensus est (A/G)(A/C)ACCCANNCA(C/T)(C/T) (Buchman *et al.*, 1988). Cette liaison a été démontrée par différentes techniques (Conrad *et al.*, 1990; Gotta *et al.*, 1996; Strahl-Bolsinger *et al.*, 1997; Wright, J. H. *et al.*, 1992). Chez les mammifères, les protéines TRF1 et TRF2 lient majoritairement l'ADN télomérique (Bilaud *et al.*, 1997; Broccoli *et al.*, 1997; Chong *et al.*, 1995).

Les régions sous-télomériques, ainsi que les gènes apposés à proximité d'un télomère seront, quant à eux, assemblés en nucléosomes

(Wright, J. H. *et al.*, 1992). Chez *S. cerevisiae*, les histones H3 et H4, ainsi que la protéine Sir2p ayant une activité désacétylase et les protéines Sir3p et Sir4p sont nécessaires pour l'assemblage de l'hétérochromatine. Sir2p fait partie de la famille des protéines désacétylases NAD-dépendantes et sa principale cible serait les queues N-terminales des histones H3 et H4. Ce qui fait de Sir2p un enzyme pouvant potentiellement générer des régions nucléosomales hypoacétylées au niveau de l'hétérochromatine (Braunstein *et al.*, 1993; Imai *et al.*, 2000; Landry *et al.*, 2000). Les protéines Sir3p et Sir4p lient, quant à elles, les queues N-terminales des histones H3 et H4, du moins *in vitro*, et préférentiellement celles qui sont hypoacétylées (Carmen *et al.*, 2002; Hecht *et al.*, 1995). Une étude suggère que Sir3p interagirait directement avec l'histone H4 *in vivo* (Johnson *et al.*, 1990). L'assemblage de l'hétérochromatine serait peut-être alors dû à des changements au niveau des modifications des histones (Jenuwein et Allis, 2001; Richards et Elgin, 2002). Il a été démontré que la délétion de la queue N-terminale d'une ou l'autre des histones H3 et H4 compromettrait la répression transcriptionnelle au niveau des loci *HML* et *HMR*, ainsi que des télomères (Johnson *et al.*, 1992; Kayne *et al.*, 1988; Tsukamoto *et al.*, 1997). En outre, le simple remplacement de la lysine 16 de l'histone H4 (un site majeur d'acétylation chez la levure) pour une glutamine ou glycine entraîne de répression de la transcription (Johnson *et al.*, 1990; Megee *et al.*, 1990).

En plus de modifier et lier les histones, les protéines Sir interagissent entre elles. Sir4p lie fortement Sir2p, et cette interaction pourrait être celle permettant le recrutement de Sir2p au loci *HML* et *HMR*, ainsi qu'aux télomères (Cuperus *et al.*, 2000; Hoppe *et al.*, 2002; Moazed *et al.*, 1997; Strahl-Bolsinger *et al.*, 1997). Sir4p interagit aussi avec elle-même, suggérant son fonctionnement sous forme de dimère *in vivo* (Cano *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2003; Chien *et al.*, 1991; Murphy *et al.*, 2003). Finalement, en absence de Sir2p et indépendamment de la chromatine, Sir4p lie Sir3p (Hecht *et al.*, 1996; Strahl-Bolsinger *et al.*, 1997). Ces trois protéines Sir forment un complexe nommé SIR et ce sont les interactions entre les protéines Sir3/Sir4 et les histones H3 et H4 qui établissent et maintiennent une chromatine silencieuse (Rusche *et al.*, 2003). De plus, l'extrémité C-terminale de Sir4p lie les protéines Rap1p, Yku70p et Ubf3p (Moazed et Johnson, 1996; Moretti *et al.*, 1994; Moretti et Shore, 2001; Tsukamoto *et al.*, 1997). L'interaction de ces protéines avec la protéine Sir4p entière est difficilement détectable.

L'assemblage de la chromatine silencieuse télomérique comporte différentes étapes. Tout d'abord, les protéines permettant le recrutement, dont Rap1p et peut-être Yku, lieraient l'ADN télomérique et initieraient l'assemblage d'une chromatine silencieuse jusqu'aux régions sous-télomériques. Ces protéines recruteraient alors le complexe SIR par liaison avec Sir4p et peut-être Sir3p. Ensuite, des cycles de désacétylation par Sir2p auraient lieu successivement et le recrutement de complexes SIR

supplémentaires permettrait leur propagation [revue dans (Moazed *et al.*, 2004)].

Cette hétérochromatine télomérique sera responsable de la répression de la transcription exercée au niveau des télomères, phénomène appelé « telomere position effect » (TPE). L'étude du TPE chez la levure, se fait en juxtaposant un gène de sélection auxotrophique à un télomère particulier. Le système couramment employé utilise les gènes *URA3* et *ADE2* qui seront insérés au niveau des télomères VII-L et V-R respectivement dans une orientation précise, de façon à être adjacent aux séquences télomériques. L'expression des gènes utilisés est réversible, instable et alterne d'un état réprimé à un état actif, ce changement d'état est alors contrôlé épigénétiquement. L'expression du gène *ADE2* sera observable par la coloration des cellules allant de rouge (*ade2⁻*) à blanche (*ADE2⁺*). Elles pourront présenter des secteurs blancs et d'autres rouges au sein d'une même colonie indiquant le changement d'état. Le gène *URA3* rend possible l'utilisation d'une sélection négative à l'aide du 5-FOA dont le fonctionnement biochimique sera discuté plus loin. De cette façon les cellules exprimant *URA3* ne pourront pousser sur un milieu contenant du 5-FOA, alors que celles dont l'expression de *URA3* sera réprimée pourront croître sur un tel milieu (Gottschling *et al.*, 1990).

La réplication complète des chromosomes

Les ADN polymérases conventionnelles ont pour propriétés de ne synthétiser l'ADN que dans la direction 5'-3' et d'utiliser une amorce d'ARN pour initier cette synthèse. Or, suite à la synthèse, les amorces d'ARN utilisées seront dégradées, créant alors plusieurs trous qui seront pour la plupart comblés par le mécanisme conventionnel de réplication. Cependant, celui présent à l'extrémité 5' du brin C-riche du télomère nouvellement synthétisé ne le sera pas. Ce qui, par conséquent, provoque une perte d'information génétique graduelle aux extrémités des chromosomes. L'autre extrémité du chromosome aura, quant à elle, une extrémité franche. En absence d'un système permettant le maintien des télomères, plusieurs eucaryotes vont perdre des séquences terminales à un rythme de 3-5pb/extrémité/division, alors que les télomères humains et de souris vont raccourcir beaucoup plus rapidement à un rythme de 50-150 pb/extrémité/division [revue dans (Smogorzewska et de Lange, 2004)].

Les eucaryotes ont alors dû se prévaloir d'un système alternatif de réplication, lors de l'acquisition de génome linéaire, puisque les propriétés des enzymes de la machinerie conventionnelle de réplication posent un problème majeur quant à la réplication complète de chromosomes linéaires. En effet, ces chromosomes sont voués à être répliqués de façon incomplète lors de leur duplication par ces enzymes. Or, les télomères sont essentiels pour le

maintien de l'intégrité des chromosomes, et donc pour la survie cellulaire. Il a alors été proposé que l'ADN télomérique devait servir de matrice pour un mécanisme alternatif de réplication. L'enzyme responsable de ce mécanisme fût identifié chez *Tetrahymena* en 1985 par Greider et Blackburn et porte le nom de télomérase. Elle fût par la suite découverte chez plusieurs autres organismes, notamment l'humain et la levure (Cohn et Blackburn, 1995; Morin, 1989).

La télomérase possède les caractéristiques d'une transcriptase inverse, et par conséquent, peut allonger le brin G-riche en utilisant à titre de matrice, la séquence contenue dans l'ARN qui la compose, ce qui en fait une ribonucléoprotéine. La télomérase est alors un enzyme ribonucléoprotéique à deux composantes. Elle contient une transcriptase inverse hautement conservée nommée TERT (telomerase reverse transcriptase) et un ARN matrice associé, appelé TERC (ou TR ou TER) (telomerase RNA component). L'addition de séquences répétées au télomère se fait en quatre étapes. La télomérase nécessite une extrémité 3' simple-brin comme substrat, il a été proposé que l'extrémité 5' du brin avancé serait dégradée par une exonucléase spécifique au brin C-riche afin de recréer cette extension perdue suite à la réplication conventionnelle (Lingner et Cech, 1996; Wellinger *et al.*, 1996). Il pourra alors y avoir allongement de l'extrémité G-riche par la télomérase. Finalement, suite à l'élongation de l'extrémité 3', le brin C-riche sera effectuée par les ADN polymérases α et δ (Adams Martin *et al.*, 2000;

Diede et Gottschling, 1999). Les chromosomes nouvellement formés auront alors une courte extension 3' simple-brin à chacune de leurs extrémités, qui est essentielle pour la liaison de certaines protéines.

Bien que la séquence et la taille de l'ARN de la télomérase soient hautement variables, elles partagent des motifs structuraux qui permettent son interaction avec TERT ou contrôlent les étapes d'alignement, d'extension et de translocation. Outre son ARN, la télomérase est composée de plusieurs sous-unités protéiques accessoires, mais il s'avère que seulement la sous-unité catalytique et la matrice ARN sont nécessaires pour son activité *in vitro* [revue dans (Smogorzewska et de Lange, 2004)].

La télomérase de *S. cerevisiae*

Chez *S. cerevisiae*, une télomérase fonctionnelle nécessite la transcription de cinq gènes essentiels. Quatre d'entre eux ont été identifiés grâce à différents criblages génétiques effectués dans les années 1989-1996. Ces criblages avaient pour but d'identifier des mutants dont l'activité télomérase était absente et qui avaient, du même coup, des problèmes au niveau de la réplication des télomères. C'est alors que *EST1*, *EST2*, *EST3* et *EST4* ont été identifiés (Lendvay *et al.*, 1996; Lundblad et Szostak, 1989). Le gène *EST4* correspondant à la mutation *cdc13-2^{est}* fût ensuite reconnu comme étant *CDC13* (Lendvay *et al.*, 1996). L'identification du cinquième

gène, c'est-à-dire de la composante ARN de la télomérase, *TLC1*, fût obtenue d'un criblage recherchant des facteurs impliqués dans le silencing transcriptionnel (Singer et Gottschling, 1994). Des mutations dans un de ces cinq gènes mèneront à un raccourcissement progressif des télomères d'environ 3 à 5 pb par génération et à une diminution graduelle de la viabilité cellulaire observée après 50 à 100 générations, puis à la sénescence. Ce phénotype est appelé « Ever Shorter Telomeres » (*est*) (Lendvay *et al.*, 1996; Lundblad et Blackburn, 1993; Lundblad et Szostak, 1989; Singer et Gottschling, 1994). Toutefois, certaines cellules d'une population sénescence vont réussir à éviter ce processus et devenir des survivants. La génération de survivants en absence de la télomérase a été étudiée plus particulièrement dans des souches *est1Δ* de *S. cerevisiae* (Lundblad et Blackburn, 1993). Selon cette étude, il existerait deux classes de survivants basées sur le patron des fragments de restriction produits suite à la digestion d'ADN génomique avec l'enzyme *XhoI* et obtenus par un processus de recombinaison dépendant de Rad52p permettant le maintien des télomères. La première classe, les survivants de type I, auront des télomères très courts et une amplification des éléments sous-télomériques Y' (Lundblad et Blackburn, 1993). La seconde classe, les survivants de type II, auront des télomères très longs et hétérogènes pouvant atteindre jusqu'à 12kb (Le *et al.*, 1999; Lundblad et Blackburn, 1993; Teng *et al.*, 2000; Teng et Zakian, 1999). Des survivants de types I et II ont été observés dans les souches *tlc1*, *est2*, *est3* et *cdc13/est4* (Lendvay *et al.*, 1996). Souvent les survivants de type I seront

convertis en survivants de type II, dont la structure peut être conservée jusqu'à 250 générations.

EST1, EST2, EST3 et CDC13/EST4

Chez la levure, la protéine Est2p (produit du gène *EST2*), de 103 kDa, exerce les fonctions catalytiques de l'enzyme. Mis à part Est2p, trois classes de protéines composent la télomérase. Le premier groupe est composé, entre autre, de Est1p (produit du gène *EST1*), une protéine de 82 kDa, mais aussi de Cdc13p et Est3p. Le modèle présentement accepté propose que Cdc13p interagirait avec Est1p, permettant ainsi le recrutement de la télomérase à la fin des télomères (Pennock *et al.*, 2001) et/ou activerait en quelque sorte la télomérase déjà présente aux télomères (Taggart *et al.*, 2002). En effet, il a été démontré qu'un problème au niveau du maintien des télomères du mutant *cdc13-2^{est}* (mutation Glu-Lys) peut être supprimé par une mutation spécifique et complémentaire dans *EST1* (mutant *est1-60*, mutation Lys-Glu). Le phénotype *est* des mutants *cdc13* pourrait être explicable si l'interaction entre Cdc13p et Est1p est nécessaire pour le recrutement de la télomérase aux extrémités télomériques (Pennock *et al.*, 2001). Plusieurs expériences réalisées en fusionnant des gènes, soient la fusion de Cdc13p ou son domaine de liaison à l'ADN (DBD) avec certains constituants protéiques de la télomérase, tels que Est2p, Est1p et Est3p, vont de pair avec ce modèle. De telles fusions permettent le rétablissement du maintien des télomères des

souches *cdc13-2^{est}* et *est1Δ*. Par exemple, Est1p n'est plus nécessaire pour le maintien des télomères lorsque le DBD de Cdc13p est fusionné à Est2p, suggérant ainsi que l'interaction entre Cdc13p et Est1p permettrait le recrutement de la télomérase à la fin des télomères et que ce recrutement est une étape essentielle pour le maintien des télomères (Evans et Lundblad, 1999; Pennock *et al.*, 2001).

En plus de son rôle dans le recrutement de la télomérase, Est1p pourrait en avoir un de régulateur positif indépendant du recrutement. En effet, dans les cellules exprimant à la fois la protéine de fusion Est2p-Cdc13 et Est1p, on observe des télomères plus longs (Evans et Lundblad, 1999; Pennock *et al.*, 2001). De plus, certains allèles mutants *est1* n'ont pas ce rôle de régulateur positif, alors que d'autres sont incapables de permettre le recrutement, mais peuvent stimuler l'élongation des télomères lorsque la protéine de fusion Cdc13p-Est2p est exprimée (Evans et Lundblad, 2002). Est1p pourrait alors occuper plusieurs fonctions dans le maintien des télomères.

Finalement, la protéine Est3p (produit du gène *EST3*), de 20 kDa, fait elle aussi partie du complexe de la télomérase et est essentielle pour son activité *in vivo* (Lendvay *et al.*, 1996). Cependant, les fonctions de cette protéine demeurent inconnues.

Yku et les protéines Sm

Le second groupe de protéines constituant la télomérase est composé de l'hétérodimère Yku, dont il sera question plus loin. Il est possible que Yku collaborait au recrutement de la télomérase (Peterson *et al.*, 2001). Finalement, le troisième groupe est composé de protéines impliquées dans l'assemblage et la maturation de la télomérase, dont les protéines Sm qui font parties de ce groupe (Seto *et al.*, 1999).

Les snRNPs (small nuclear ribonucleoproteins) U1, U2 et U4/U6-U5 sont des composantes essentielles de la machinerie d'épissage chez les eucaryotes. Ceux-ci contiennent un ensemble de protéines appelées les protéines Sm. Chez les eucaryotes, les protéines sont très conservées et on les retrouve au nombre de sept, nommées SmB, SmD1, SmD2, SmD3, SmE (SmE1), SmF (Smx3) et SmG (Smx2). Les mammifères comptent une protéine supplémentaire parmi le complexe qui est appelée SmB' (Lührmann *et al.*, 1990). Les protéines Sm sont à la fois requises pour la formation de snRNPs stables et pour le transport nucléaire de ces particules (Mattaj, I. W., 1986; Mattaj, I.W., 1988; Will et Lührmann, 2001). Le complexe Sm, de pair avec le capuchon methyl-2,2,7-guanosine (m₃G) composent le signal de localisation nucléaire. Ce capuchon est formé de la façon suivante : tout d'abord, les protéines Sm lient les snRNPs, cette liaison provoquera l'hyperméthylation du capuchon 7-methyl du snRNP par une méthylase qui

mènera à la formation du capuchon m₃G (Mattaj, I. W., 1986; Plessel *et al.*, 1994). Des études suggèrent qu'au sein des protéines SmB, SmD1 et SmD3 on retrouverait une extension de la portion C-terminale, appelée queue C-terminale et que ces queues permettraient la formation d'une protubérance riche en acides aminés basiques qui serait reconnue comme le déterminant de la localisation nucléaire chez la levure, alors que chez l'humain rien n'est connu à ce sujet. Cette protubérance pourrait aussi lier différentes protéines à différentes étapes de l'assemblage du snRNP (Bordonne, 2000).

La composante ARN de la télomérase, *TLC1*

Tel que mentionné précédemment, la télomérase est dotée d'une composante ARN. Le gène encodant pour cet ARN, retrouvé sur le chromosome II, est nommé *TLC1* (« telomerase component 1 ») chez la levure *S. cerevisiae*. *TLC1* est un ARN transcrit par l'ARN polymérase II, dont la séquence de la matrice est CACCACACCCACACAC (Singer et Gottschling, 1994). Sa taille approximative de 1300 nucléotides en fait un ARN relativement grand, comparativement à celui de la télomérase humaine, nommé hTR, dont la taille est de 451 bases (Feng *et al.*, 1995; Singer et Gottschling, 1994). Les travaux de Mme. Stéphanie Larose (*Université de Sherbrooke*) semblent démontrer que l'expression de l'ARN *TLC1* ne serait pas régulée dans le cycle cellulaire, mais serait plutôt constitutive (données non publiées). L'ARN de la télomérase est sujet à différentes étapes de

maturation et d'assemblage, dont la polyadénylation, En fait, on retrouve l'ARN TLC1 sous deux formes, soit la forme polyadénylée, la moins abondante, et la forme non-polyadénylée, la plus abondante (Chapon *et al.*, 1997). Une autre étape de maturation de l'ARN TLC1 consiste en l'hyperméthylation de son extrémité 5' se faisant via l'acquisition d'un capuchon 5'-trimethylguanosine (Seto *et al.*, 1999). Finalement, l'association de l'ARN TLC1 avec les protéines Sm et les protéines Est permettra son transport intracellulaire et son assemblage en télomérase (Chapon *et al.*, 1997; Ferrezuelo *et al.*, 2002; Seto *et al.*, 1999; Teixeira *et al.*, 2002). Certaines étapes de maturation auraient lieu dans le cytoplasme. En 2002, les travaux de Ferrezuelo et de Teixeira proposèrent que l'ARN serait synthétisé dans la noyau, puis importé dans le cytoplasme pour son assemblage avec les composantes protéiques de l'enzyme, pour être ensuite retourné au noyau et accomplir ses fonctions. L'ARN servirait alors non seulement de matrice pour l'ajout de séquences télomériques, mais il fournirait aussi des sites de liaison à plusieurs des protéines du complexe (Ferrezuelo *et al.*, 2002; Teixeira *et al.*, 2002).

La très grande taille de l'ARN de la télomérase des souches de levures, ainsi que la disponibilité limitée de leurs séquences posaient un problème quant à la détermination de la structure secondaire de l'ARN TLC1 via une approche phylogénétique. Ce type d'approche est fréquemment utilisé pour la détermination de la structure secondaire des ARN (James, B. D. *et al.*,

1989; Pace *et al.*, 1989; Zaug et Cech, 1995). C'est pourquoi sa structure n'a été proposée que récemment par différentes équipes (Chappell et Lundblad, 2004; Dandjinou *et al.*, 2004; Lin, J. *et al.*, 2004; Zappulla et Cech, 2004). La première à être proposée, fût celle de (Dandjinou *et al.*, 2004). Celle-ci montre la présence de sept hélices principales (I à VII) émergeant d'une boucle centrale. Ces hélices peuvent ensuite être subdivisées en segments, mais aussi regroupées en régions fonctionnelles. Ces régions sont les suivantes : la région centrale liée entre autre par Est2p et Est1p (comprenant les hélices III, IVa-IVc, V, VI, la région matrice, la région délimitant la matrice et le pseudo-noeud potentiel de l'hélice IIa), la région liée entre autre par Yku (comprenant les hélices IIa-IId) et la région distale en 3' incluant le site Sm (comprenant les hélices VIIa-VIIc et la portion 3' simple-brin terminale) (Dandjinou *et al.*, 2004). Chez *S. cerevisiae*, il a été démontré que l'hétérodimère Yku lie un élément de la structure secondaire de l'ARN. En effet, ils ont démontré que Yku liait directement une tige-boucle de 48 nucléotides correspondant à une portion de l'hélice IIc de TLC1 (Peterson *et al.*, 2001; Stellwagen *et al.*, 2003). Est1p lierait une tige-boucle séparée correspondant à l'hélice IV de la structure secondaire déterminée par (Dandjinou *et al.*, 2004) (Seto *et al.*, 2002), alors que Est2p lierait probablement une région plus complexe de la région centrale (Livengood *et al.*, 2002). Cependant, certaines régions ne semblent pas avoir de fonctions, comme les hélices I et VII, alors que d'autres pourraient être liées par des protéines autres que celles connues, comme les hélices II, III, IV, V et VI.

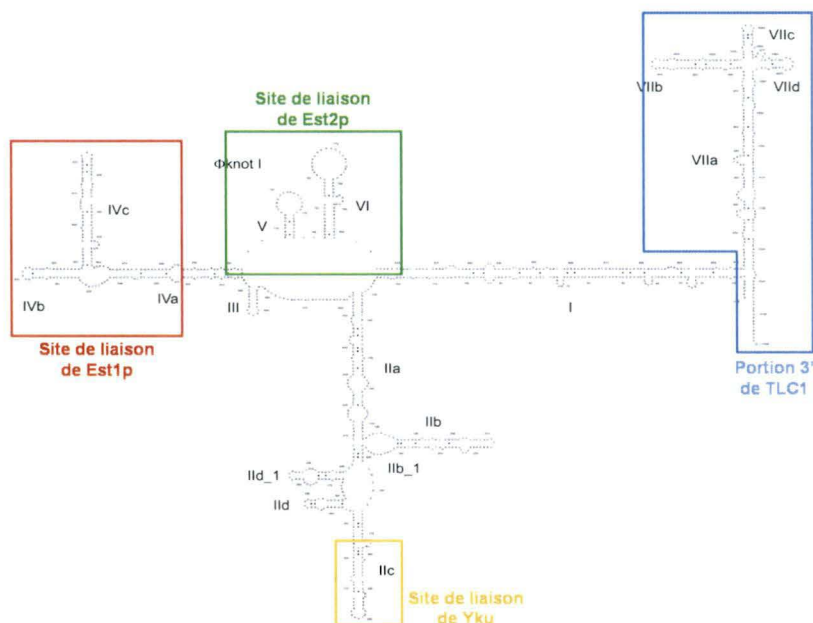


Figure 2. Structure secondaire de l'ARN de la télomérase de levure.

La structure proposée par Dandjinou *et al.*, 2004, comprend sept hélices numérotées de I à VII qui peuvent être subdivisées en segments. Les sites de liaison des protéines Est1p (rouge), Est2p (vert) et Yku (orange) au niveau de l'ARN sont encadrés. Ces encadrés correspondent aux portions d'ARN utilisées pour les contrôles, ainsi qu'à la portion 3' de l'ARN TLC1 (bleu) utilisée pour la première partie du criblage global de l'ARN de la télomérase.

Certains chercheurs prétendent que l'ARN de la télomérase pourrait avoir une activité catalytique (Miller et Collins, 2002; Tzfati *et al.*, 2000). Ils appuient leurs suspicions sur des exemples qui ont montré que certains éléments de l'ARN appariés au niveau des bases formeraient la frontière de la matrice (template boundary) et que cet appariement aurait pour fonction de s'assurer que la transcription inverse est arrêtée entre chaque cycle (Tzfati *et al.*, 2000). La région matrice de l'ARN n'est pas la seule partie simple-brin de l'ARN TLC1 et chez *S. cerevisiae*, il n'a pas encore été démontré comment Est2p pouvait reconnaître cette séquence d'une autre. Par contre, chez *Tetrahymena*, des études ont démontré qu'une courte séquence de

reconnaissance de la matrice (template-recognition sequence element) dirigerait l'utilisation des nucléotides en 5' adjacents comme matrice pour la synthèse de l'ADN (Miller et Collins, 2002).

La régulation de la télomérase de levure

La fin des télomères est reconnue pour servir de point d'ancrage pour la régulation de la télomérase. Celle-ci pourrait avoir lieu au niveau de son recrutement à la fin des télomères, de l'initiation de l'élongation ou du taux et de la processivité des cycles d'élongation. Chez *S. cerevisiae*, la régulation de la télomérase se fait à plusieurs niveaux, dont le recrutement de la télomérase aux télomères. Le recrutement est régulé entre autre via des protéines liant l'ADN double et simple-brin télomérique. Ces protéines liant le simple-brin télomérique sont impliquées dans la régulation de la télomérase, puisque l'extrémité 3' simple-brin ne peut pas à la fois lier ces protéines et permettre l'alignement de la matrice de l'ARN de la télomérase. Précédemment, il a été abondamment question d'une de ces protéines, soit Cdc13p, et son rôle de régulateur y avait été abordé en détails. Rap1p, quant à elle, lie l'ADN double-brin télomérique, ainsi que Rif1p et Rif2p. Cette liaison amène la formation d'une chromatine fermée empêchant l'accès de la télomérase au télomère. Les télomères raccourciront alors à cause d'une réplication incomplète, amenant le nombre de protéines liées à ce télomère à diminuer, ce qui aura pour effet de le rendre de plus en plus accessible pour la télomérase

(Marcand *et al.*, 1997a; Marcand *et al.*, 1997b; Ray et Runge, 1998; Ray et Runge, 1999).

En plus de son rôle dans la régulation positive du maintien des télomères, Cdc13p limiterait l'élongation des télomères. Dans les mutants *cdc13-5*, les télomères ont quatre fois leur taille normale et des extensions G-riche extrêmement longues à la fin de la phase S devenant, par la suite, des duplexes. Le tout suggère qu'il y aurait un problème au niveau de la coordination de la synthèse du brin retardé avec l'élongation des télomères dans ces cellules (Chandra *et al.*, 2001). Des études de surexpression de Stn1p dans les mutants *cdc13-5* et de l'ADN polymérase α suggèrent que cette protéine régulerait la synthèse du brin C-riche (Chandra *et al.*, 2001; Grandin *et al.*, 1997). Suite à ces études, un modèle en deux étapes a été proposé dans lequel Cdc13p recruterait la télomérase aux télomères, permettant l'extension du brin G-riche. Et que par la suite, Cdc13p en collaboration avec Stn1p permettrait la synthèse du brin C-riche et limitant alors l'élongation des télomères par la télomérase (Chandra *et al.*, 2001).

La télomérase humaine

Chez l'humain, la sous-unité catalytique de la télomérase est appelée hTERT, alors que sa matrice d'ARN est nommée hTR (Feng *et al.*, 1995; Meyerson *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 1997). Cette dernière est d'une taille

de 451 pb et la séquence de sa matrice est CUAACCCUAAC (Feng *et al.*, 1995). La télomérase humaine est aussi composée d'autres protéines. Le génome humain compte au moins trois orthologues de *EST1*, dont deux, *EST1A* et *EST1B*, qui encodent pour les protéines associées à la télomérase (Snow *et al.*, 2003). Des orthologues humains de *EST3* n'ont pas encore été identifiés jusqu'à présent et il n'y a pas d'indication que la télomérase humaine interagirait avec les protéines Sm. La télomérase humaine interagirait plutôt avec une autre protéine liant l'ARN, soit la dyskérine. hTERC contient un motif H/ACA constituant le site de liaison de la dyskérine (Mitchell *et al.*, 1999). Ce type de motif est conservé parmi les ARNs de la télomérase chez les vertébrés (Chen *et al.*, 2000), mais est absent chez ceux de la levure et des ciliés.

La régulation de la télomérase humaine se fait à plusieurs niveaux. Il s'avère que l'expression de la télomérase est réduite dramatiquement dans les cellules somatiques lors du développement embryonnaire, alors qu'elle est activée dans les cellules germinales, dans la majorité des lignées cellulaires transformées et dans 85% des cellules cancéreuses primaires (Counter *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1994; Shay et Bacchetti, 1997). Entre autre, la répression transcriptionnelle du gène hTERT, effectuée par un répresseur encodé sur le même chromosome, va mener à une perte d'activité télomérase (Szutorisz *et al.*, 2003). Une particularité de la régulation de l'accessibilité de la télomérase au télomère chez l'humain, est que les longs télomères adopteraient une

structure de « t-loop » dans lequel l'ADN télomérique formerait un cercle (Griffith *et al.*, 1999). Celui-ci protégerait le télomère contre la dégradation, mais aussi bloquerait l'accès de la télomérase au télomère.

YKU : UNE PROTÉINE MULTIFONCTIONNELLE

L'hétérodimère Ku semble jouer un rôle dans la grande majorité des fonctions attribuées aux télomères qui ont été élaborées précédemment. Ku fût à l'origine identifié comme étant un autoantigène dans le sérum de patients ayant des maladies autoimmunes (Mimori *et al.*, 1981). Chez l'humain, le complexe Ku est composé de sous-unités de 70 et 86 kDa. L'hétérodimère Ku lie spécifiquement les extrémités d'ADN double-brin et les discontinuités de l'ADN tels les trous et coupures (Blier *et al.*, 1993; Paillard et Strauss, 1991). Il forme, avec une sous-unité catalytique de 465 kDa, la protéine kinase ADN-dépendante, DNA-PKcs (Gottlieb et Jackson, 1993). L'implication de ces protéines dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN, ainsi que dans des événements de recombinaison vient de phénotypes observés lorsqu'une de ces protéines est mutées, soit une sévère sensibilité aux radiations ionisantes, ainsi qu'un problème au niveau de la recombinaison V(D)J.

La structure de Yku : des informations provenant de l'humain

Chez la levure, l'hétérodimère Yku (« Yeast Ku ») est, quant à lui, composé d'une sous-unité de 70 kDa, Yku70p, et d'une autre de 80 kDa, Yku80p (Feldmann *et al.*, 1996; Feldmann et Winnacker, 1993). Le complexe Yku lie les extrémités d'ADN double-brin indépendamment de leur séquence (Feldmann et Winnacker, 1993). La cristallisation de l'hétérodimère Ku chez l'humain démontre bien cette réalité (Walker *et al.*, 2001). Les structures de Ku70 et Ku80 en présence ou non d'ADN montrent que ces deux protéines partagent trois domaines topologiques, soient un domaine α/β en N-terminal, un domaine central β -barrel et un bras C-terminal. L'association des sous-unités forme une molécule quasi-symétrique en forme d'anneau encerclant l'ADN. Deux de ces domaines contribuent à l'hétérodimérisation. Tout d'abord, les domaines β -barrel forment la surface liant l'ADN, ainsi que la structure en forme d'anneau dans laquelle ce dernier passe. Les bras hélicoïdaux en C-terminal de chacune des sous-unités sont, quant à eux, en contact avec le domaine β -barrel de la sous-unité opposée. Les domaines α/β N-terminaux, retrouvé en périphérie de l'hétérodimère, seraient potentiellement impliqués dans les interactions avec d'autres protéines. Il demeure toutefois inconnu comment Ku se dissocie des extrémités d'ADN et comment sa translocation est effectuée *in vivo*.

Les fonctions de Yku

Tel que mentionné précédemment, Yku est une composante essentielle du NHEJ chez la levure. Il a été démontré que Yku était relâché des télomères en réponse à un dommage à l'ADN et était recruté rapidement au niveau des cassures double-brin de l'ADN. Le complexe Yku est aussi impliqué dans le maintien de l'intégrité des télomères. En effet, plusieurs phénotypes seront observés dans les cellules *yku⁻* (portant la délétion de *yku70* et/ou *yku80*). Tout d'abord, on observe un raccourcissement de la longueur des répétitions télomériques (Boulton et Jackson, 1996a; Porter *et al.*, 1996). De plus, les télomères des cellules *yku⁻* vont acquérir une longue extension simple-brin du brin G-riche qui sera présente durant tout le cycle cellulaire, alors que normalement elle ne l'est qu'en phase S (Gravel *et al.*, 1998; Wellinger *et al.*, 1993a; Wellinger *et al.*, 1993b). En outre, les sous-unités du complexe Yku interagissent génétiquement avec Cdc13p (Gravel *et al.*, 1998; Nugent *et al.*, 1998). Yku est aussi impliqué dans la répression transcriptionnelle des gènes situés à proximité des télomères, phénomène appelé TPE. En effet, le TPE est énormément diminué dans les cellules *yku⁻*, alors que la répression transcriptionnelle du loci du mating silencieux est maintenue (Boulton et Jackson, 1998; Gravel *et al.*, 1998; Laroche *et al.*, 1998; Nugent *et al.*, 1998). Finalement, l'hétérodimère Yku est impliqué dans l'organisation sous-nucléaire des télomères, puisqu'une mutation du

complexe Yku provoque une délocalisation des télomères normalement retrouvé au niveau de foci en périphérie du noyau (Laroche *et al.*, 1998).

Il semble que les différentes fonctions de l'hétérodimère Yku ne soient pas exercées absolument par les deux sous-unités, puisque certains allèles de séparation de fonction ont été isolés (Roy *et al.*, 2004) et qu'une étude a démontré qu'une portion de Yku70p était nécessaire pour le maintien des télomères, mais pas pour les fonctions de Yku dans le NHEJ (Driller *et al.*, 2000), soit une portion de la partie C-terminale de Yku70p.

DOUBLE / TRIPLE-HYBRIDE

LE SYSTÈME DOUBLE-HYBRIDE

Cette méthode a été développée par (Fields et Song, 1989), ainsi que (Chien *et al.*, 1991) pour identifier des interactions entre protéines. Cette technique est basée sur la particularité que le facteur de transcription Gal4p soit physiquement séparable en deux domaines : le domaine de liaison à l'ADN (Gal4p BD) et le domaine d'activation de la transcription (Gal4p AD). Le Gal4p BD va cibler le facteur de transcription aux séquences spécifiques de certains promoteurs, soient les *UAS* (upstream activating sequence). Le

Gal4p AD, quant à lui, va faciliter l'assemblage du complexe de transcription pour permettre l'initiation de la transcription des gènes rapporteurs. En fusionnant ces domaines avec les protéines à étudier, le facteur de transcription se trouve reconstitué lorsque les deux protéines étudiées interagissent entre elles et active ainsi la transcription des gènes rapporteurs de la souche utilisée (Chien *et al.*, 1991; Fields et Song, 1989). La figure 4 illustre bien le double-hybride, mais plus particulièrement, la stratégie employée dans cette étude, qui sera détaillée à la section matériel et méthodes.

LE SYSTÈME TRIPLE-HYBRIDE

Inspirée du double-hybride, cette méthode, dont un exemple est schématisé à la figure 5, a été développée par (SenGupta *et al.*, 1996) pour identifier des interactions ARN-protéine. Les fondements demeurent les mêmes que pour le double-hybride, mais un hybride d'ARN relie les hybrides protéiques (SenGupta *et al.*, 1996). C'est LexA qui sera utilisé en remplacement du Gal4p BD, et qui liera la séquence spécifique *UAS* retrouvée en amont des gènes rapporteurs de la souche utilisée. Le Gal4p AD est toujours utilisé pour activer la transcription des gènes rapporteurs suite à l'interaction entre l'ARN et la protéine.

OBJECTIFS

Depuis plusieurs années, de nouvelles composantes télomériques ont été identifiées chez la levure *S. cerevisiae*. Il est fort probable que d'autres ne l'ont pas encore été et le seront dans les années à venir. L'hétérodimère Yku et l'ARN de la télomérase font partie de ces éléments et jouent des rôles importants dans la cellule qui ne sont pas entièrement compris. Différents criblages ont alors été entamés, ou encore achevés, dans le but d'identifier d'autres protéines télomériques ou impliquées de près ou de loin avec la télomérase. L'étude qui a été réalisée comportait trois sections. Tout d'abord, la première consistait à identifier de nouveaux partenaires protéiques de l'hétérodimère Yku et à les caractériser. Pour ce faire, l'approche qui a été utilisée est le double-hybride. Bien que l'hétérodimère soit étudié depuis plusieurs années maintenant, la seconde partie consistait à vérifier si les sous-unités du complexe Yku pouvaient avoir des activités indépendantes ou si les fonctions lui étant attribuées n'étaient effectives que dans son ensemble. Finalement, la dernière portion de l'étude consistait à identifier de nouveaux partenaires de l'ARN de la télomérase afin de mieux comprendre son importance, ses fonctions, ainsi que sa maturation. La méthode employée consiste à effectuer un criblage triple-hybride en plusieurs parties en utilisant comme proies des portions de l'ARN de la télomérase, *TLC1*.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

TECHNIQUES DE CLONAGE

Les manipulations d'ADN, telles que les digestions par des enzymes de restrictions, les déphosphorylations, la création d'extrémités franches, la purification de fragments d'ADN et les ligations, ont été effectuées telles que décrites dans (Sambrook *et al.*, 1989), ou encore selon le protocole fourni par la compagnie.

Certaines digestions par des enzymes de restriction, dont entre autre les digestions d'ADN génomique de levure, ont été réalisées avec un tampon universel appelé le « Magic buffer » (1X Magic buffer, 0.01M DTT, 0.1% Digitonine, 0.1mg/ml RNase). Tous les enzymes de restrictions utilisés proviennent des compagnies suivantes : Amersham Biosciences (*Baie d'Urfé, QC*), NEB (*Pickering, ONT*) et Roche (*Laval, QC*). La CIAP provenant de la compagnie Promega (*Nepean, ONT*), fût utilisée pour effectuer les déphosphorylations, alors que la *E. coli* DNA Polymerase I Klenow fragment, provenant de NEB (*Pickering, ONT*), fût utilisée pour la création d'extrémités franches. La purification sur gel d'agarose de fragments d'ADN a été réalisée avec les produits QIAGEN (*Mississauga, ONT*). Finalement, les ligations furent effectuées à l'aide de la T4 DNA ligase de NEB (*Pickering, ONT*).

La transformation dans les bactéries, suite à un clonage, a été réalisée telle que décrite dans (Sambrook *et al.*, 1989). Les bactéries utilisées sont les DH5 α . La sélection des plasmides en bactéries se fait à l'aide d'un milieu LB contenant 1 μ g/ml d'ampicilline (Sambrook *et al.*, 1989).

PLASMIDES

Minipréparation d'ADN

L'isolation de l'ADN plasmidique des bactéries a été effectuée selon le protocole standard de minipréparation d'ADN décrit dans (Sambrook *et al.*, 1989), sauf pour les échantillons préparés pour le séquençage, dont l'ADN plasmidique fût extrait avec l'ensemble pour miniprep de QIAGEN (*Mississauga, ONT*) selon le protocole fourni par la compagnie.

Constructions plasmidiques

L'ADN génomique d'une souche de levure de type sauvage fût utilisé à titre de matrice dans les réactions de PCR, à moins d'indications contraires.

Les constructions plasmidiques utilisées dans cette étude sont illustrées à la figure 3. La construction pGBD-YKU70 (Figure 3A) contient un fragment de 1937 pb, obtenu par PCR en utilisant les amorces HDF1DH et

KU70-REVERSE. Ce dernier fût inséré au site *BamHI* du vecteur pGBD-C3 (James, P. *et al.*, 1996). Le plasmide pGBD-YKU80 (Figure 3B) contient le fragment *HindIII-NdeI* du plasmide pRS425-YKU80 (Ref. Michel Larrivée, Université de Sherbrooke), dont les extrémités ont été rendues franches. Ce fragment fût inséré au site *Clal* du vecteur pGBD-C1 (James, P. *et al.*, 1996). Ces deux constructions ont été réalisées par M. Michel Larrivée. Les constructions pGBD-YKU70/80 (Figure 3C) et pGBD-YKU80/70 (Figure 3D) ont été réalisées à partir des constructions pGBD-YKU70 et pGBD-YKU80. Dans ces dernières furent introduits respectivement, au site *PvuII* de chacun des plasmides, les fragments *XhoI-BamHI* (YKU80) provenant du plasmide pRS425-YKU80 et *XhoI-HindIII* (YKU70) provenant du plasmide pRS426-YKU70 (Réf. Michel Larrivée). Les extrémités de ces fragments furent rendues franches avant leur introduction dans les plasmides. Les constructions pGAD-YKU70 (Figure 3E) et pGAD-YKU80 (Figure 3F) ont été bâties approximativement de la même façon que les constructions précédentes. Cependant, les vecteurs dans lesquels les fragments ont été insérés sont respectivement pGAD-GH et pGAD-C1 (James, P. *et al.*, 1996). La construction pGAD-YKU70 fût produite par M. Michel Larrivée. Les plasmides pGAD-YKU70/80 (Figure 3G) et pGAD-YKU80/70 (Figure 3H) ont été formés de la même façon que les constructions pGBD précédentes, mais à partir des constructions pGAD-YKU70 et pGAD-YKU80. La construction pGAD-SIR4 (Figure 3I), réalisée par M. Michel Larrivée, renferme le fragment *EcoRI-Sall* de 4077 pb, produit par PCR à l'aide des amorces SIR4-E-

FORWARD et SIR4-S-REVERSE. Ce fragment fût ensuite introduit dans le vecteur pGAD-C3 (James, P. *et al.*, 1996) linéarisé *EcoRI-Sall*. Le plasmide pGAD-EST1 (Figure 3J) contient le fragment *BamHI-PstI* de 2124 pb, produit par PCR au moyen des amorces FOREST1BAMHI et REVEST1PSTI. Celui-ci fût incorporé dans le vecteur pGAD-C1 linéarisé *BamHI-PstI*. La construction pGAD-EST2 (Figure 3K) a été réalisée exactement de la même façon, mais le fragment généré par PCR est de 2703 pb et, les amorces utilisées sont : FOREST2BAMHI et REVEST2PSTI.

Le plasmide pIIIEX-1XYKUST (Figure 3L) a été produit à l'aide du fragment correspondant aux 48 nt de la tige-boucle de *TLC1* liée par Yku, tel que démontré dans (Peterson *et al.*, 2001; Stellwagen *et al.*, 2003). Ce fragment fût produit par l'hybridation des oligonucléotides 5'RIBA-TLCST et 3'RIBG-TLCST, puis inséré au site *EcoRI* du vecteur pIIIEX426RPR (Good et Engelke, 1994) duquel les sites *BamHI* et *BglII* ont préalablement été éliminés. La construction pIIIEX-1XYKUST Mut a été produite de la même façon, mais le fragment introduit contient les trois mutations empêchant la formation de la tige-boucle, tel que démontré dans (Peterson *et al.*, 2001; Stellwagen *et al.*, 2003). Les oligonucléotides utilisés sont 5'RIBA-TLCSTMUT et 3'RIBG-TLCSTMUT. Le plasmide pIIIEX-3XYKUST (Figure 3M) a été construit tel que décrit dans (Potter, 1996). Brièvement, un second insert (correspondant à la tige-boucle de 48 nt de *TLC1* et digéré par *BamHI* et *BglII*) a d'abord été introduit au site *BglII* du plasmide pIIIEX-1XYKUST. Puis,

un troisième fragment digéré *BamHI* et *BglII* a été inséré au site *BglII* de la construction précédente contenant deux inserts. La construction résultante contient alors trois répétitions en tandem des 48 nt de la tige-boucle de *TLC1* liée par Yku. Le plasmide pIIIEX-3XYKUST Mut a été réalisé de la même façon que le pIIIEX-3XYKUST, mais les inserts ajoutés dans le pIIIEX-1XYKUST Mut, contiennent les trois mutations empêchant la formation de la tige-boucle (Peterson *et al.*, 2001; Stellwagen *et al.*, 2003).

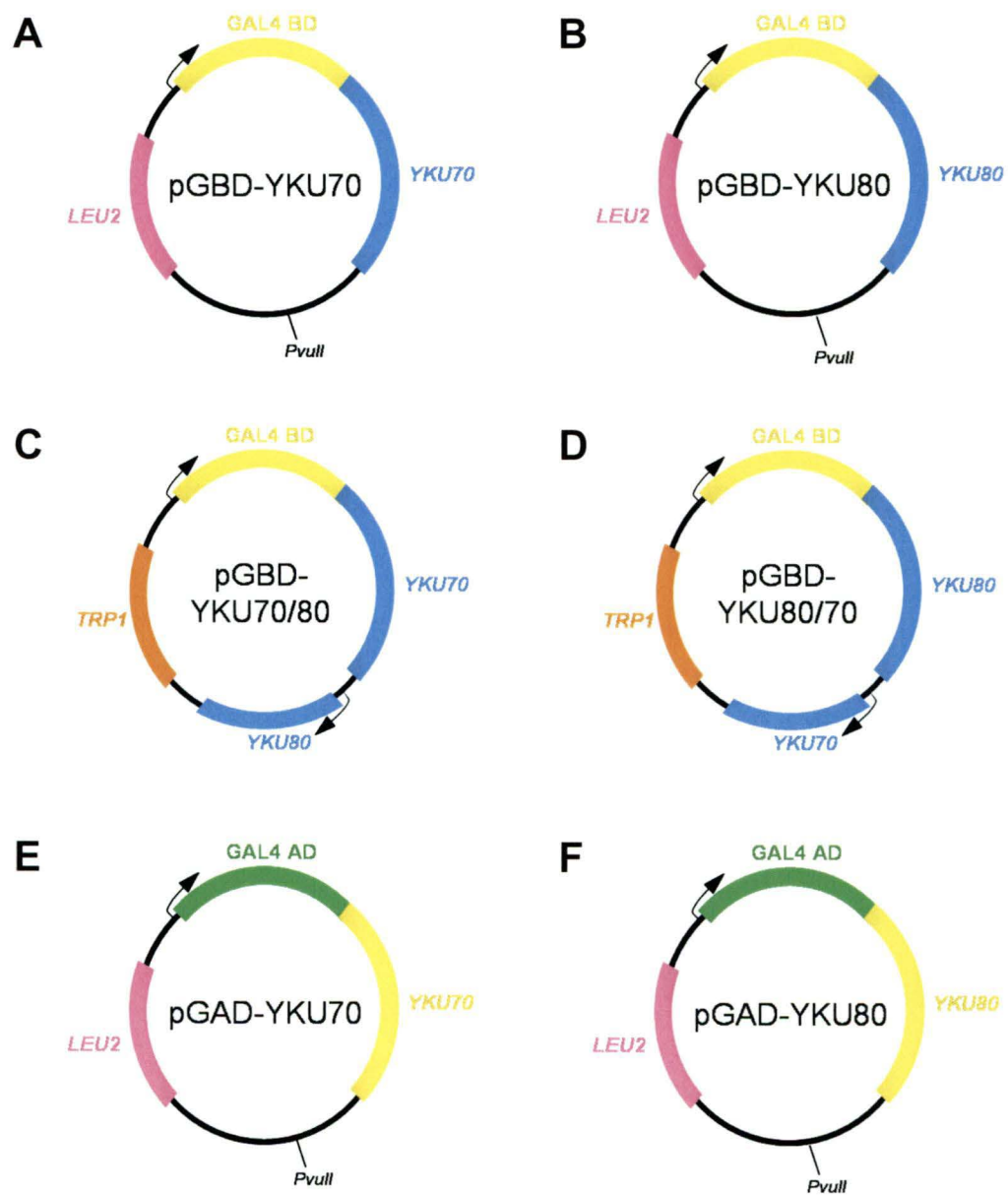
Les plasmides pMS2-1XYKUST (Figure 3N) et pMS2-3XYKUST (Figure 3O) ont été réalisés à l'aide des fragments respectivement au site *SmaI* du vecteur pIII/MS2-2 (fournit par le Dr. Gilles Boire, *Université de Sherbrooke*) décrit dans *EcoRI* des plasmides pIIIEX-1XYKUST et pIIIEX-3XYKUST, dont les extrémités furent rendues franches, pour être ensuite incorporés (SenGupta *et al.*, 1996). Un fragment de 203 pb, amplifié par PCR avec les amorces FOREST1stemXMAINOTI et REVEST1stemXMAI, fût inséré au site *XmaI* du vecteur pIII/MS2-2, générant ainsi la construction pMS2-EST1ST (Figure 3P). Tel qu'illustré à la figure 2, ce fragment correspond à la tige IV de *TLC1* (Dandjinou *et al.*, 2004). Le plasmide pMS2-EST2ST (Figure 3Q) a été produit par l'insertion d'un fragment de 201 pb (amplifié par PCR à l'aide des amorces FOREST2stemXMAINOTI et REVEST2stemXMAI) au site *XmaI* du vecteur pIII/MS2-2. Ce fragment correspond aux tiges V et VI de *TLC1*, tel qu'illustré à la figure 2. La construction pMS2-3'ST (Figure 3R) fût générée en introduisant un fragment

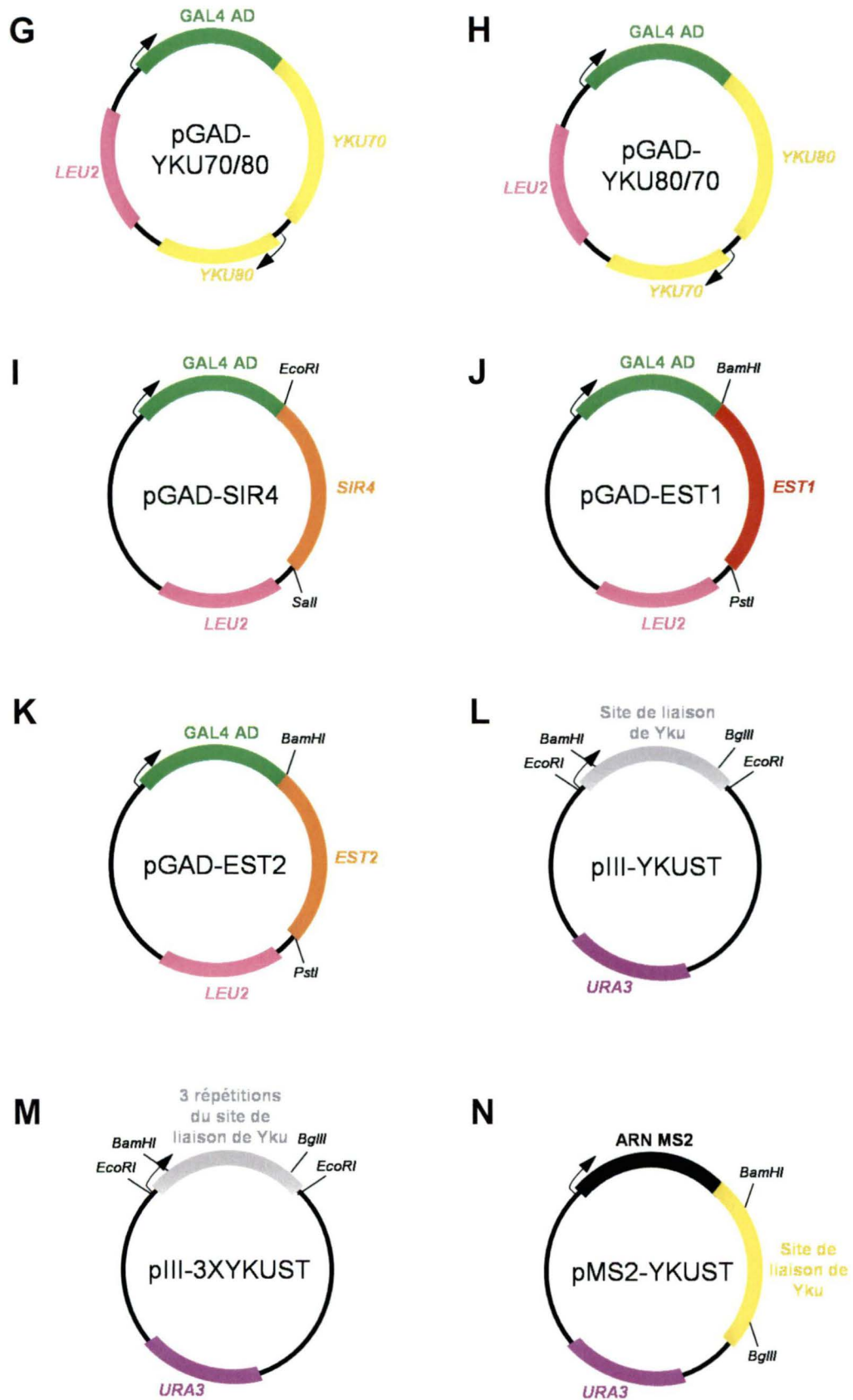
de 279 pb, amplifié par PCR en utilisant les amorces : FORTLC3stemXMAINOTI et REVTL3stemXMAI, au site *XmaI* du vecteur pIII/MS2-2. Tel qu'illustré à la figure 2, ce fragment correspond aux 8 nt en 5' de *TLC1* suivis de la tige VII de *TLC1*.

Au site *BamHI* du plasmide pVII-L URATEL (Gottschling *et al.*, 1990), fût introduit un fragment de 140 pb produit par PCR à l'aide des amorces GAL10uasFOR et GAL10uasREV, générant le plasmide pVII-L URATEL-UASg (Figure 3S).

Une dernière série de constructions a été utilisée, soit pVA3 (permettant l'expression de la protéine de fusion BD_{Gal4p}-p53, *TRP1*) et pTD (permettant l'expression de la protéine de fusion AD_{Gal4p}-antigène grand T de SV40, *LEU2*) pour les contrôles en double-hybride (Chien *et al.*, 1991). La construction pHR10-6 (Figure 3T) (Singer et Gottschling, 1994) (fournit par le Dr. Daniel Gottschling, *Fred Hutchinson Cancer Research Center*) contient une séquence homologue à la partie terminale du bras droit du chromosome V suivie du gène *ADE2*, puis d'une séquence correspondant à des répétitions télomériques. Les constructions pLEXA-MS2 (permettant la production de la protéine de fusion LexA-protéine du manteau du virus MS2, *TRP1*), pMS2-IRE (permettant la production de l'hybride d'ARN : ARN MS2-IRE, *URA3*) et pGAD-IRP (permettant la production de la protéine de fusion AD_{Gal4p}-IRP, *LEU2*) furent utilisées pour le criblage triple-hybride (SenGupta *et al.*, 1996).

Ces trois dernières ont été fournies par le Dr. Gilles Boire. Finalement, la construction pSLE14 (permettant l'expression de la protéine Est1p comportant quatre mutations ponctuelles silencieuse qui empêchent la formation d'une tige-boucle au sein de l'ARN, *URA3*), gracieusement fournie par Mme. Stéphanie Larose (*Université de Sherbrooke*), a servi lors de la validation des plasmides pGAD-EST1.





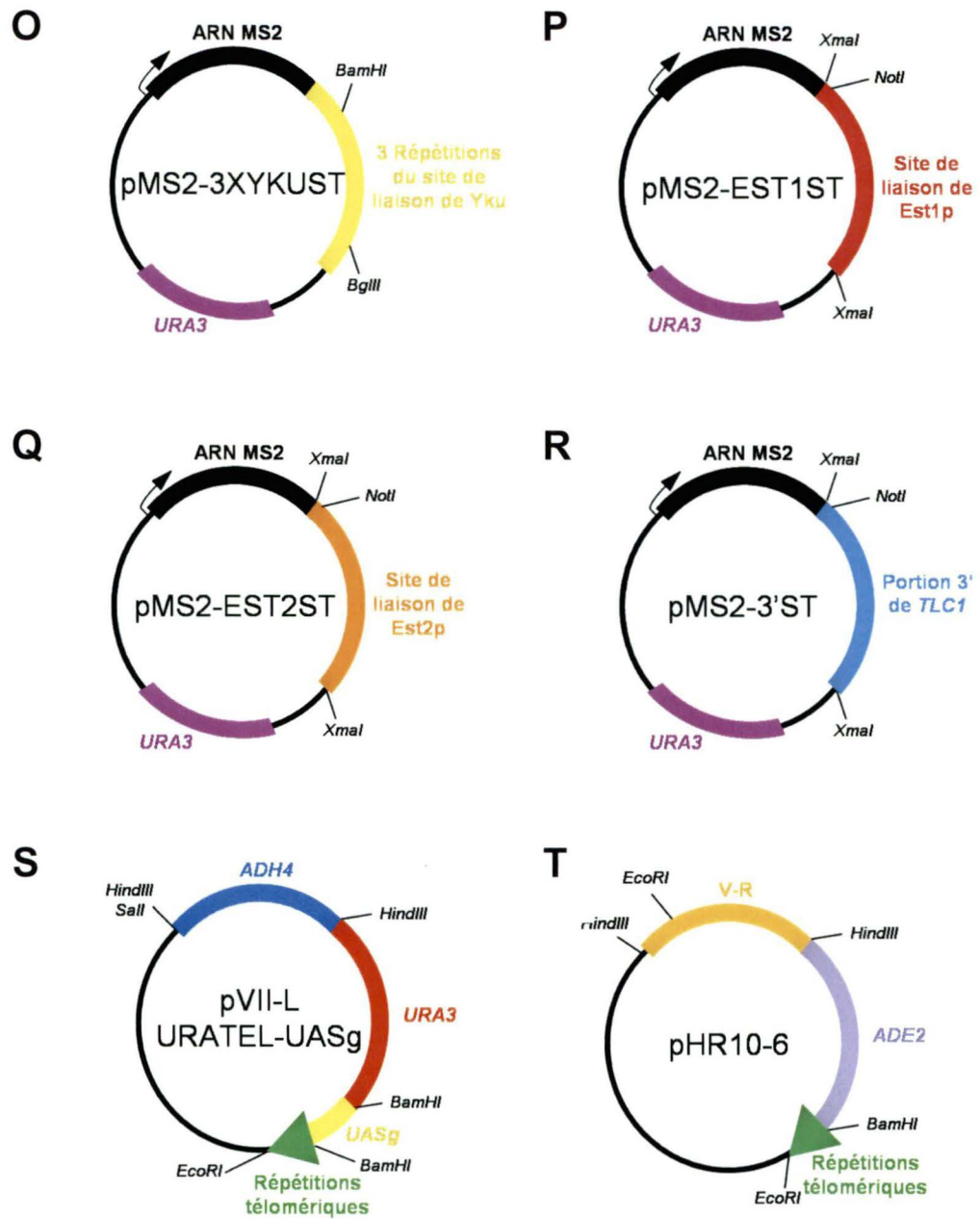


Figure 2. Constructions plasmidiques.

(A) pGBD-YKU70, (B) pGBD-YKU80, (C) pGBD-YKU70/80, (D) pGBD-YKU80/70, (E) pGAD-YKU70, (F) pGAD-YKU80, (G) pGAD-YKU70/80, (H) pGAD-YKU80/70, (I) pGAD-SIR4, (J) pGAD-EST1, (K) pGAD-EST2, (L) pIIIEX-1XYKUST, (M) pIIIEX-3XYKUST, (N) pMS2-1XYKUST, (O) pMS2-3XYKUST, (P) pMS2-EST1ST, (Q) pMS2-EST2ST, (R) pMS2-3'ST, (S) pVII-L URATEL-UASg, (T) pHR10-6.

ÉLECTROPORATION D'ADN PLASMIDIQUE EN BACTÉRIES

L'électroporation dans les bactéries a été utilisée afin de récupérer et éventuellement isoler le plasmide, provenant de la librairie, des clones positifs de levure obtenus lors des criblages double et triple-hybride. Une faible quantité d'extrait d'ADN de levure est mis en présence de bactéries MC1066 [*r⁻*, *m⁺*, *trpC9830*, *leuB6*, *pyrF::Tn5(Kan^R)*, *lacΔx74*, *strA*, *galU*, *galK*] électrocompétentes. La sélection des plasmides dans ces bactéries se fait au départ à l'aide d'un milieu LB contenant 1μg/μl d'ampicilline. La particularité des bactéries MC1066 origine de son génotype permettant une sélection auxotrophique des plasmides au même titre que la levure. Il est alors possible de faire une sélection plasmidique selon les marqueurs de sélection qu'il renferme (en l'occurrence *URA3*, *LEU2* ou *TRP1*) à l'aide d'un milieu M9 ne contenant pas les acides aminés appropriés, soient l'uracile, la leucine ou le tryptophane. L'électroporation est faite avec les « Gene Pulser[®] Cuvette » de 2mm, préalablement refroidies, de BIO-RAD (*Mississauga, ONT*), au moyen de l'appareil Gene Pulser de BIO-RAD selon le protocole décrit par (Hengen, 1995).

PÉTRI MAÎTRE (MASTER PLATE) ET RÉPLIQUA

Les colonies bactériennes, obtenues de la transformation suite à un clonage ou en vue d'isoler un plasmide, sont piquées sur un Pétri

LB+ampicilline dans les cases d'une grille apposée sur ce dernier. Le Pétri est ensuite incubé à 37°C pour ~ 16 heures. Pour faire un répliqua de ce Pétri, on le presse sur un velours pour qu'il y ait transfert d'une certaine quantité de bactéries. Par la suite, un nouveau Pétri est pressé sur le velours ayant les bactéries et est incubé par la suite à 37°C pour ~ 16 heures. Pour l'isolation d'un plasmide de la librairie, le Pétri maître est répliqué sur deux Pétris : un contenant un milieu M9-Trp et l'autre contenant un milieu M9-Leu. Alors que les réplicats standards se font sur milieu LB+ampicilline.

DÉTECTION DE CLONES PAR HYBRIDATION DE COLONIES (COLONY LIFT ASSAY)

Cette méthode développée par (Grunstein et Hogness, 1975) et décrite dans (Sambrook *et al.*, 1989), consiste à transférer les colonies d'un Pétri maître sur une membrane de nylon, Hybond-N+ (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC), par contact direct, pour ensuite procéder à différentes étapes menant à la lyse bactérienne. Ces étapes sont approximativement les mêmes que celles d'une extraction d'ADN plasmidique (voir minipréparation d'ADN), mais se font directement par contact de la membrane avec des papiers Whatman 3MM imbibés des différentes solutions utilisées. Par la suite, on procède à l'hybridation de la membrane, comme on le fait pour un buvardage de type Southern, en utilisant une sonde appropriée pour l'insert que l'on veut détecter.

PCR

La grande majorité des inserts utilisés dans les clonages ont été produits par PCR, de même que les fragments permettant d'effectuer des délétions de gènes. Les réactions ont été réalisées avec soit les PureTaq PCR beads (Amersham Biosciences, *Baie d'Urfé, QC*) ou la Klentaq (Sigma-Aldrich, *Oakville, ONT*), selon les protocoles fournis avec les billes ou l'enzyme. La liste des différentes amorces utilisées se trouve à la fin de la section matériel et méthodes sous la rubrique **OLIGONUCLÉOTIDES**.

SOUCHES ET CULTURES DE LEVURES

Les souches de levures utilisées pour cette étude sont décrites dans le tableau 1. Les levures sont cultivées en milieu liquide sélectif ou striées sur milieu sélectif solide (YEPD ou YC) à 30°C pour 16 à 72 heures (Rose *et al.*, 1990), à l'exception de la sélection lors d'un criblage double ou triple-hybride où la période d'incubation est de sept jours.

Tableau 2. Souches utilisées pour les criblages double et triple-hybride, l'étude des fonctions de Yku et les essais de complémentation.

SOUCHE	GÉNOTYPE	Origine
PJ69-4a	<i>MATa, trp1-901, leu2-3,112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, GAL2-ADE2, LYS2::GAL1-HIS3, MET2::GAL7-lacZ</i>	James, P. <i>et al.</i> , 1996
PJ69-4α	<i>MATα, trp1-901, leu2-3,112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, GAL2-ADE2, LYS2::GAL1-HIS3, MET2::GAL7-lacZ</i>	James, P. <i>et al.</i> , 1996
MLY100	<i>MATa, yku70::KANMX, trp1-901, leu2-3,112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, GAL2-ADE2, LYS2::GAL1-HIS3, MET2::GAL7-lacZ</i>	Michel Larrivée, Université de Sherbrooke
MRY100	<i>MATα, yku80::KANMX, trp1-901, leu2-3,112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, GAL2-ADE2, LYS2::GAL1-HIS3, MET2::GAL7-lacZ</i>	Cette étude
LRY100	<i>MATa, yku70::KANMX, yku80::KANMX, trp1-901, leu2-3,112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, GAL2-ADE2, LYS2::GAL1-HIS3, MET2::GAL7-lacZ</i>	Cette étude
LRY110	<i>MATa, Chr.V-R::ADE2, Chr.VII-L::UASg-URA3, yku70::KANMX, yku80::KANMX, trp1-901, leu2-3,112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, GAL2-ADE2, LYS2::GAL1-HIS3, MET2::GAL7-lacZ</i>	Cette étude
Pta	<i>MATa, ilv⁻, hom3, can^R</i>	N-D.
PTα	<i>MATα, ilv⁻, hom3, can^R</i>	N-D.
MRY101+pSLE14	<i>MATa, est1-Δ::HIS3, trp1-Δ1, leu2-Δ1, ura3-52, his3-Δ200, lys2-801, ade2-101, CF-SUP11-TRP1 / pSLE14 (CEN, URA3, EST1)</i>	Cette étude
est2Δ + pVL291	<i>MATa, est2::LYS2, trp1-Δ1, leu2-Δ1, ura3-52, his3-Δ200, lys2-801, ade2-101 / pVL291 (CEN, URA3, EST2)</i>	Lundblad, V. et Skostak, J.W., 1989
L40-ura3	<i>MATa, trp1Δ1, leu2-3112, -52, , his3Δ200, gal4Δ, gal80Δ, LYS ::(lexAop)-HIS3, ura3::(lexAop)-LacZ</i>	Sengupta <i>et al.</i> , 1996

DÉLÉTION DU GÈNE YKU80 D'UNE SOUCHE DE LEVURE : CRÉATION DE LA SOUCHE MRY100

Un fragment de PCR a été produit en utilisant les amorces YKU80D-FORWARD et YKU80D-REVERSE, ainsi que le plasmide pRS400 à titre de matrice. Ce fragment permet le remplacement, par recombinaison, du gène YKU80 par la cassette *KanMX4*, conférant à la souche une résistance au

G418 (Geneticin provenant de GibcoBRL, *Burlington, ONT*) (Brachmann *et al.*, 1998). Le fragment (1µg) est alors transformé dans la souche PJ69-4α, selon le protocole cité ci-bas. Les cellules sont ensuite resuspendues dans un milieu YEPD et incubées à 30°C, ~16heures. Ensuite elles sont étalées sur plusieurs Pétri contenant un milieu YEPD+200ng/ml G418, puis incubées à 30°C pour quelques jours. Les colonies obtenues sont alors striées sur milieu YEPD+200ng/ml G418 pour s'assurer qu'elles sont bel et bien résistantes à l'antibiotique. La délétion est ensuite vérifiée par buvardage de type Southern. Cette méthode est décrite dans (Baudin *et al.*, 1993).

***CROISEMENT, SPORULATION ET ISOLATION DE SPORES PAR MICRODISSECTION :
CRÉATION DE LA SOUCHE LRY100***

Croisement

La souche MRY100 a été croisée avec la souche MLY100 (réalisée par Michel Larrivée) en striant chacune des souches l'une par-dessus l'autre sur un milieu YEPD que l'on incube à 30°C jusqu'à croissance. Une bonne quantité de cellules sont prélevées et restriées sur milieu YEPD afin de les isoler.

Sélection des diploïdes

Les diploïdes sont ensuite sélectionnés par un essai déterminant le mating type. Pour ce faire, on croise les diploïdes à vérifier individuellement avec les souches PTa et PT α en les striant, tel que décrit précédemment, sur un milieu Ymin que l'on incube ensuite à 30°C 2-3 jours. Les diploïdes seront alors ceux ne pouvant pas croître sur un tel milieu.

Sporulation et microdissection

Par la suite, ils sont mis en sporulation. Pour ce faire, les cellules sont lavées, resuspendues dans une solution 0,5% KAc, puis incubées à 23°C pour une période minimale de 72 heures. Une fois sporulées, les cellules sont traitées avec la Zymolyase-100T (provenant de MJS Biolynx INC., Brockville, ONT), puis on procède à l'isolation des spores par microdissection (Rose *et al.*, 1990). Les spores sont ensuite analysées par passage sur un milieu YEPD+200ng/ μ l G418. On sélectionne alors une tétrade dont la ségrégation s'est faite tel un NPD (non-parental ditype), c'est-à-dire que deux spores porteront la double délétion *yku70::KANMX* et *yku80::KANMX*, alors que les deux autres seront de type sauvage. Une des deux spores portant la double délétion sera alors sélectionnée, pour être appelée LRY100.

TRANSFORMATION DE LEVURE

Les différentes souches de levures utilisées ont été transformées selon la méthode au lithium d'acétate, telle que décrite dans (Gietz et Woods, 2005).

CROISSANCE PAR DILUTION EN SÉRIE (SPOT TESTS)

Les souches à étudier sont cultivées jusqu'en phase exponentielle, à une D.O._{660nm} entre 0,6 et 1,0. Chacune des cultures est ensuite diluée en série pour que, dans les différents points déposés sur milieu sélectif, il y ait de 10 à 100 000 cellules. Pour chacun des points, 10µl de la dilution sont déposés sur le milieu sélectif approprié.

EXTRACTION D'ADN DE LEVURE

L'ADN génomique utilisé pour les gels de télomères et celui extrait des clones positifs du criblage par double-hybride ont été extraits selon le protocole de (Bloom et Carbon, 1982). Alors que l'ADN de levure des clones positifs du criblage par triple-hybride a quant à lui été extrait selon un protocole simplifié. Celui-ci comporte plusieurs étapes. Tout d'abord, prélever 1ml de culture et le centrifuger à 13 000 rpm pendant quelques secondes afin de faire culoter les cellules. Ensuite, resuspendre les cellules dans 200µl de

tampon de lyse (2% Triton X-100, 1% SDS, 0.1M NaCl, 0.01M Tris pH 8.0, 0.001M EDTA) et ajouter 300µl d'un mélange phénol/chloroforme ainsi qu'approximativement 50µl de billes de verre (4-5µm). Vortexer le tout 5X50 sec avec alternance sur glace. Ajouter 200µl d'une solution 0.3M NaoAc dans TE. Centrifuger 10 min. à 13 000 rpm et récupérer le surnageant. Ajouter un volume d'isopropanol et centrifuger 30 min. à 13 000 rpm pour précipiter l'ADN. Finalement, resuspendre le culot d'ADN dans ~30µl de TE.

GELS DE TÉLOMÈRES ET HYBRIDATION DANS LE GEL (IN-GEL)

Cette méthode est utilisée pour observer la structure terminale des chromosomes, soit le simple-brin télomérique. L'ADN génomique de levure est préalablement digéré à l'aide d'un enzyme de restriction, majoritairement *XhoI*, mais aussi à l'occasion dans cette étude par *BglII* ou *PstI*, permettant le relâchement d'un TRF de taille variant selon l'enzyme utilisé. L'ADN digéré est ensuite migré sur gel d'agarose 0,75% TBE pour quelques heures à faible voltage (~0.8V/cm). Le gel est ensuite immergé dans 2X SSC (0.3M NaCl, 0.03M Citrate de sodium, pH 7.0) pendant 30 min., puis séché 20-45 min. à l'aide du BIO-RAD 583 dryer. Le gel est ensuite hybridé avec un oligonucléotide (généralement CA5-2) radiomarké au [γ -³²P]ATP, tel que décrit dans (Dionne et Wellinger, 1996). Cet oligonucléotide radiomarké est appelé sonde C₁₋₃A. Un contrôle est utilisé pour s'assurer que les conditions natives sont respectées, soit le contrôle simple-brin/double-brin (ctrl sb/db).

Celui-ci est composé d'un mélange d'ADN double-brin (fragment *BamHI* du pMW55) et simple-brin (ADN produit d'un phagemide à partir du pGT75) (Dionne et Wellinger, 1996). Il est à noter que le gel de télomères peut, par la suite, être dénaturé et transféré sur membrane par buvardage de type Southern.

BUVARDAGE DE TYPE SOUTHERN

L'analyse de l'ADN par buvardage de type Southern est fait tel que décrit dans (Dionne et Wellinger, 1996). Tout d'abord, l'ADN est digéré et migré sur gel quelques heures. Par la suite, le gel est traité de sorte que l'ADN soit dénaturé à même le gel. Tout d'abord, il est dépuriné dans une solution 0.25M HCl, 15 min. Ensuite, le gel est immergé dans la solution de dénaturation (1.5M NaCl/0.5M NaOH) pour 1 heure. Finalement, le gel est équilibré dans la solution de transfert (0.4M NaOH), 15 min. On procède alors au transfert par capillarité sur membrane de nylon, Hybond-N+, en conditions dénaturantes. La membrane est ensuite séchée, pré hybridée et hybridée avec une sonde d'ADN radiomarquée au [α -³²P]dCTP, puis lavée et exposée. La membrane utilisée provient de la compagnie Amersham Biosciences (*Baie d'Urfé, QC*).

MARQUAGE D'OLIGONUCLÉOTIDES AU $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$

L'oligonucléotide, CA5-2, est utilisé pour l'hybridation des gels de télomères. Il correspond à 22 nt de séquences dégénérées C/A. Le marquage au ^{32}P se fait avec la T4 PNK provenant de USB (*Baie d'Urfé, QC*) tel que décrit dans (Dionne et Wellinger, 1996). Brièvement, le tout consiste à incuber 200ng de l'oligonucléotide dans la solution de réaction (tampon T4 PNK 1X, 9.8 unités d'enzyme et 5 μl de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$) à 37°C pour une période de 45 min. Par la suite, 80 μl de TE sont ajoutés et l'enzyme est inactivé à 65°C, 10min. Finalement, la sonde est purifiée sur colonne microspin G-50, provenant de Amersham Biosciences (*Baie d'Urfé, QC*), selon le protocole fourni. Le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ utilisé provient de la compagnie Perkin-Elmer (*Boston, MA*) et son activité spécifique est de 3000Ci/mmol.

MARQUAGE DE FRAGMENTS D'ADN AU $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$

Sondes

Les différentes sondes utilisées dans cette étude se retrouvent dans le tableau 2. Le marquage se fait avec la Klenow provenant de NEB (*Pickering, ONT*) selon le protocole de (Feinberg et Vogelstein, 1984). Le $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ utilisé, dont l'activité spécifique est de 3000Ci/mmol, provient de la compagnie Perkin-Elmer (*Boston, MA*).

Marqueur

Le marqueur de taille 1Kb ladder, provenant de la compagnie Sigma-Aldrich (Oakville, ONT), est marqué au ^{32}P avec la T4 DNA Polymerase tel que décrit dans Sambrook.

Tableau 3. Sondes utilisées pour les buvardages de type Southern.

NOM DE LA SONDE	FRAGMENT	TAILLE
ADE2	Fragment <i>HindIII</i> du gène <i>ADE2</i>	~ 1,2 kb
EST1	ORF complet du gène <i>EST1</i>	~ 2,0 kb
EST2	ORF complet du gène <i>EST2</i>	~ 2,6 kb
KANMX	Fragment <i>BglII-EcoRI</i> du vecteur pRS400	~ 1,45 kb
PCT300	Fragment <i>EcoRI</i> du vecteur pCT300	~ 300 pb
URA3	Fragment <i>NdeI-StuI</i> du vecteur pRS426	~ 2,0 kb
Y'	Fragment <i>KpnI</i> du vecteur pVZY'K	~ 600 pb
YKU80	ORF complet du gène <i>YKU80</i>	~ 1,9 kb

PRÉPARATION D'EXTRAITS PROTÉIQUES DE LEVURES

Les levures sont cultivées à 30°C jusqu'à l'obtention d'une D.O. 660nm approximativement de 1,0. Ensuite, prélever 1ml de culture et culoter les cellules par centrifugation quelques secondes à 13 000 rpm. Resuspendre le culot de cellules dans 1ml d'eau froide et ajouter 150µl de la solution de lyse (1.85M NaOH, 5% β-mercaptoéthanol). Incuber le tout 15 min. sur glace, puis ajouter 150µl de 55% TCA et réincuber 10 min. sur glace. Par la suite, centrifuger 10 min. à 13 000 rpm et enlever le surnageant. Finalement,

resuspendre le culot dans le tampon Laemmli (0.0625M Tris pH 8.8, 2% SDS, 5% β -mercaptoéthanol, 10% glycérol, 0.01% bleu de bromophénol) et conserver à -80°C.

IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN

L'immunobuvardage de type Western a été utilisé pour s'assurer que les protéines de fusions étaient produites tel qu'anticipé. Pour ce faire, les extraits protéiques sont bouillis et migrés sur un gel SDS-PAGE 12%. Le gel est ensuite transféré sur membrane de PVDF provenant de Amersham Biosciences (*Baie d'Urfé, QC*), à l'aide de l'appareil Mini Trans-blot Cell de BIO-RAD (*Mississauga, ONT*), pendant 2 heures à 80V. La membrane est bloquée avec une solution 5% lait/PBS, puis incubée avec l'anticorps primaire anti-Gal4p BD (GAL4 (DBD), *RK5C1*) ou anti-Gal4p AD (GAL4-TA (c-10), *SC1663*) provenant de Santa Cruz Biotechnology, INC. (*Santa Cruz, CA*), dilués 1 :500 dans une solution 2% lait/PBS. Finalement, elle est incubée avec l'anticorps secondaire Ig de souris couplé à une peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories INC., *West Grove, PA*), dilué 1 :10 000 dans une solution 2% lait/PBS. Entre chacune des étapes de blocage ou d'incubation, la membrane est lavée 3X10 min. avec du PBST. La révélation est faite avec 0.1 ml/cm² de ECL plus (Amersham Biosciences, *Baie d'Urfé, QC*), pendant 5 min.

TESTS DE COMPLÉMENTATION

Pour valider les constructions dont le gène est essentiel (*EST1* et *EST2*), celles-ci ont été transformées dans la souche haploïde délétée pour le gène en question et contenant un plasmide (marqueur de sélection *URA3*) complétant pour la délétion, soit respectivement les souches MRY101+pSLE14 et *est2Δ*+pVL291. Par la suite, les cellules transformées sont striées sur milieu 5-FOA-Leu, constituant le passage à 20 générations (correspondant à la perte du plasmide complétant, présent dans la souche au départ) (Boeke *et al.*, 1987). Les passages subséquents, comptant 20 générations chacun, sont effectués sur milieu YC-Leu, jusqu'à l'occurrence de 100 générations. Il est important de transformer, en parallèle, un vecteur vide ou de strier la souche sans vecteur, pour observer la sénescence. En plus de s'assurer de la complémentation par la sénescence, on la vérifie aussi au niveau de la longueur des télomères par buvardage de type Southern, et ce, pour les passages à 20 et 100 générations.

Pour ce qui est des constructions dont le gène n'est pas essentiel (*YKU70* et/ou *YKU80*), celles-ci sont transformées dans une souche haploïde portant une délétion pour le(s) gène(s) testé(s), respectivement MLY100 et MRY100, ou encore, LRY100. Par la suite, les cellules transformées sont mises en culture pour en extraire l'ADN génomique et l'on procède à un gel de télomères avec hybridation in-gel. Le gel est ensuite traité pour un

buvarpage de type Southern afin d'observer la longueur des télomères et l'uniformité du chargement des puits du gel au départ. Il est à noter que pour certaines constructions, la complémentation a été analysée seulement par la longueur des télomères ou le simple-brin télomérique.

Un autre test de complémentation a été réalisé pour les constructions pIIIEX-1XYKUST, pIIIEX-1XYKUST Mut, pIIIEX-3XYKUST, pIIIEX-3XYKUST Mut, pMS2-YKUST et pMS2-3XYKUST. Tel que réalisé dans (Peterson *et al.*, 2001), ces constructions ont été transformées individuellement dans une souche de type sauvage et les phénotypes télomériques (simple-brin et longueur des télomères) ont été analysés.

DOUBLE-HYBRIDE

Fields et Song, 1989, ainsi que (Chien *et al.*, 1991), ont développée la méthode de double-hybride. Des modifications furent par la suite apportées par (James, P. *et al.*, 1996). Dans la souche utilisée (LRY100), les promoteurs *GAL1*, *GAL2* et *GAL7*, contenant des *UAS*, sont clonés respectivement en amont des gènes rapporteurs suivants : *HIS3*, *ADE2* et *lacZ*. La figure 3 montre l'approche qui a été utilisée pour le criblage. La sélection a d'abord été faite sur milieu sélectif sans histidine et, par la suite, sur milieu sélectif sans adénine. Il aurait aussi été possible de quantifier les interactions par essai colorimétrique à l'ONPG, tel que décrit dans (Bartel *et al.*, 1996). La librairie

génomique de levure utilisée pour faire le criblage est la Y2HL (fourni par le Dr. Sherif Abou Elela, *Université de Sherbrooke*). À la figure 10, on retrouve un organigramme des différentes étapes franchies lors du criblage.

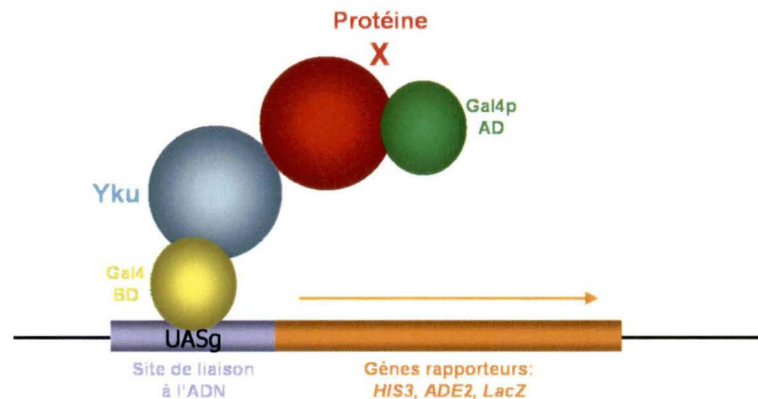


Figure 4. Stratégie utilisée pour la détection de protéines interagissant avec le complexe Yku.

Le criblage effectué par double-hybride comporte deux hybrides protéiques exprimés dans la cellule, soit la protéine de fusion du Gal4p BD avec la sous-unité de Yku utilisée et la protéine de fusion du Gal4p AD avec des fragments d'ADN génomique de levure de tailles et de séquences variables (protéine X) constituant la librairie génomique. De plus, une troisième composante a été utilisée, soit la portion de *TLC1* liée par Yku surexprimée, ce qui en fait un criblage double-hybride modifié. Le criblage double-hybride a été réalisé en deux parties : la première en utilisant comme proie Yku70p et la seconde en utilisant Yku80p. Il est à noter que l'autre sous-unité du complexe est exprimée à partir du même plasmide que la proie, mais sous la régulation de son promoteur endogène.

MARQUAGE DE CHROMOSOMES D'UNE SOUCHE DE LEVURE

Pour marquer le bras droit du chromosome V avec le gène *ADE2*, la souche LRY100 est transformée avec le fragment *EcoRI* du plasmide pHR10-6 (fourni par le Dr. Daniel Gottschling et décrit dans (Singer et Gottschling, 1994)). Par la suite, le bras gauche du chromosome VII est marqué *UASg*-

URA3 par transformation du fragment *EcoRI-SalI* du plasmide pVII-L URATEL-UASg dans la souche ayant le chromosome V-R marqué *ADE2*. Les intégrations ont été analysées par buvardage de type Southern après chacune d'entre elle. La souche obtenue est appelée LRY110.

TRIPLE-HYBRIDE

La méthode a été développée et est décrite dans (SenGupta *et al.*, 1996). La souche utilisée, la L40-*ura3* (fournie par le Dr. Gilles Boire), comporte deux gènes rapporteurs (*HIS3* et *lacZ*) clonés en aval de séquences spécifiquement reconnues par LexA, soient *lexAop*. La figure 5 montre l'approche qui a été utilisée pour le criblage effectué dans cette étude. La sélection a été faite sur milieu sélectif sans histidine contenant des concentrations variables de 3-AT selon l'étape du criblage. La figure 18 illustre les différentes étapes franchies lors du criblage. Il aurait aussi été possible de quantifier les interactions par essai colorimétrique à l'ONPG, tel que décrit dans (Bartel *et al.*, 1996).

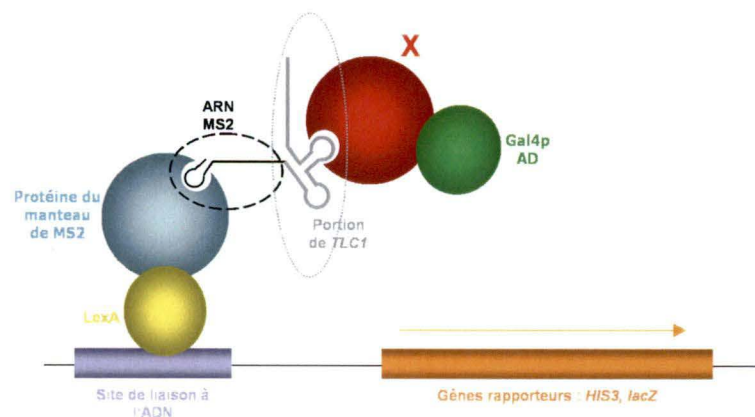


Figure 5. Stratégie utilisée pour l'identification d'autres partenaires de l'ARN de la télomérase de levure.

Le criblage par triple-hybride comporte trois éléments exprimés dans la cellule, soit la protéine de fusion de LexA avec la protéine du manteau du virus MS2, l'hybride d'ARN de l'ARN MS2 avec la portion de *TLC1* étudiée et la protéine de fusion du Gal4p AD avec des fragments d'ADN génomique de levure de tailles et séquences variables (protéine X) constituant la librairie génomique utilisée pour le criblage.

IMMUNOPRÉCIPITATION DE LA CHROMATINE (ChIP)

L'immunoprécipitation de la chromatine a été réalisée tel que décrit dans (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1997). L'anticorps monoclonal anti-Gal4p BD (GAL4 (DBD), *RK5C1*) de Santa Cruz Biotechnology (*Santa Cruz, CA*) a été utilisé pour l'immunoprécipitation (2µg). La détection est faite par buvardage de type Southern, hybridé les sondes : PCT300, URA3, ADE2 (Tableau 3).

SÉQUENÇAGE

Pour la première partie des travaux, le séquençage des constructions et des clones positifs repêchés du criblage double-hybride a été fait manuellement tel que décrit dans (Sambrook *et al.*, 1989), avec le T7 DNA Polymerase Sequencing kit provenant de la compagnie USB (*Baie d'Urfé, QC*). Tous les autres séquençages ont été fait par la plate-forme de séquençage de l'Université McGill. Pour le séquençage des constructions faites à partir des plasmides pGAD-C(x), incluant les clones repêchés des criblages, l'oligonucléotide utilisé est le pGADseq (Tableau 4). Alors que pour

les constructions faites à partir du vecteur pIII/MS2-2, l'oligonucléotide utilisé est le RPR1350ntavant (Tableau 4).

OLIGONUCLÉOTIDES

Au tableau 4, on retrouve la liste de tous les oligonucléotides utilisés dans cette étude.

Tableau 4. Oligonucléotides utilisés pour les constructions, les délétions, le séquençage et l'hybridation in-gel.

NOM	SÉQUENCE
3'RIGB-TLCST :	5'- CATGAATTCCATAGATCTTTGCATTTTCTAAACTCAGATTTT AGCCATCTAT -3'
3'RIBG-TLCSTMUT :	5'- CATGAATTCCATAGATCTTTGCATTTTCTCAACTCAGATTTT AGCCCTCTAT -3'
5'RIBA-TCLST :	5'- CATGAATTCCATGGATCCTTGTTTCTACTTATAGATGGCT AAAATCTGAG -3'
5'RIBA-TLCSTMUT :	5'- CATGAATTCCATGGATCCTTGTTTCTACTAATAGAGGGCT AAAATCTGAG -3'
CA5-2 :	5'- CCCACCACACACCCACACCC -3'
EST2DETL1REVXMAI :	5'- CTCCTCCGGGTCACATCGTTTCGATGTACGG -3'
FOREST1BAMHI :	5'- CTCGGATCCATGGATAATGAAGAAGTTAACG -3'
FOREST1stemXMAINOTI :	5'- GCTCCCCGGGGCGCCGCGTTTGCACGAGTTCGCTG -3'
FOREST2BAMHI :	5'- CTCGGATCCATGAAATCTTATTCGAGTTCA -3'
FOREST2stemXMAINOTI :	5'- GCTCCCCGGGGCGCCGCGTCGTCAGGGAACATGAG -3'
FORTLC3stemXMAINOTI :	5'- GCTCCCCGGGGCGCCGCGAGAGGATAAGCATCGGTTAGG -3'
GAL10uasFOR :	5'- CTCGGATCCAGCTAGTATTGTAGAATCTTATTGTTCCGGAG -3'
GAL10uasREV :	5'- CTCGGATCCAACCTGCTATTGCTATATTGAAGTACGGAT -3'
HDF1-DH :	5'- CTCGGATCTATGCGCTCAGTCACTAATGCA -3'
KU70-REVERSE :	5'- CTCGGATCCACAGTACAACGTTTAGCACGA -3'
pGADseq :	5'- GGTGGACGGACCAAACCTGC -3'
REVEST1stemXMAI :	5'- CTCCTCCGGGCTGACGTTCTTTTCTTTT -3'
REVEST1PSTI :	5'- CTCCTGCAGATTTTCTCCCTCACCATTACTT -3'
REVEST2PSTI :	5'- CTCCTGCAGCTGTCAGTATTTTCATGTATTATTAGT -3'
REVTLC3stemXMAI :	5'- CTCCTCCGGGCTCAAGAAAAAATGTTTCC -3'
RPR1350ntavant :	5'- TGGTTCGGCACACATTAAAGT -3'
SIR4-E-FORWARD :	5'- CTCGAATTCCCAATGCCAAATGACAATAAGAC -3'
SIR4-S-REVERSE :	5'- CTCGTCGACGTTCTTGGTATTTGATGGGTTGC -3'
YKU70D-FORWARD :	5'- CAACAGTAAAGCTATGATTTGTTAAGTGACTCTAAGCCTG AGATTGTAAGTACGAGAGTGCAC -3'
YKU70D-REVERSE :	5'- TACCCTACCCTACCAATATTGTATGTAAAGTTATAGATAC TGTGCGGTATTTACACCG -3'
YKU80D-FORWARD :	5'- AACGAGAGTGCAGGACATATGCACAAATAATATCTCAC AGATTGTAAGTACGAGAGTGCAC -3'
YKU80D-REVERSE :	5'- ACTGTGGTGACGAAACATAACTCAAAGGATGTTAGACCT CTGTGCGGTATTTACACCG -3'

III. RÉSULTATS

IDENTIFICATION DES PARTENAIRES DE YKU PAR DOUBLE-HYBRIDE

L'hétérodimère Yku occupe plusieurs fonctions dans la cellule, notamment au niveau des télomères, où il y joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité des télomères. Or, son mode d'action n'est pas bien établi. L'identification de protéines interagissant avec Yku pourrait alors apporter des informations concernant ce mode d'action. Nous avons donc effectué un criblage dans le but d'identifier ces partenaires d'interactions, et ce, par l'approche double-hybride. Un criblage précédent à celui-ci a été réalisé dans le laboratoire par M. Michel Larrivée. Ce criblage avait été fait dans la souche MLY100 et la proie utilisée était Yku70p. Cependant, après analyse, aucun clone positif n'a été repêché de ce criblage. Nous avons alors modifié l'approche. Tout d'abord, en utilisant une souche dont les deux gènes *YKU70* et *YKU80* ont été remplacés par le marqueur de sélection *KANMX*, nommée LRY100. Cette modification nous a alors permis d'utiliser comme proie soit Yku70p ou Yku80p et donc de réaliser le criblage en deux parties. Puis, à même le plasmide exprimant la protéine de fusion, l'autre sous-unité de l'hétérodimère fût exprimée. Finalement, la dernière modification apportée consistait à surexprimer la tige-boucle de 48 nt de *TLC1* liée par Yku. La

présence de cette portion d'ARN, pourrait permettre la séquestration du complexe ailleurs qu'aux télomères et/ou cassures double-brin de l'ADN, forçant ainsi sa relocalisation et l'amenant à être plus disponible pour interagir avec d'autres protéines. De plus, cet ARN pourrait permettre au complexe d'adopter une conformation plus représentative et plus stable, telle que retrouvée aux télomères, contrecarrant potentiellement l'effet produit par la fusion avec le Gal4p BD. De cette façon, il serait peut-être possible d'obtenir plus de candidats que ce qui n'a été obtenu lors du criblage précédent.

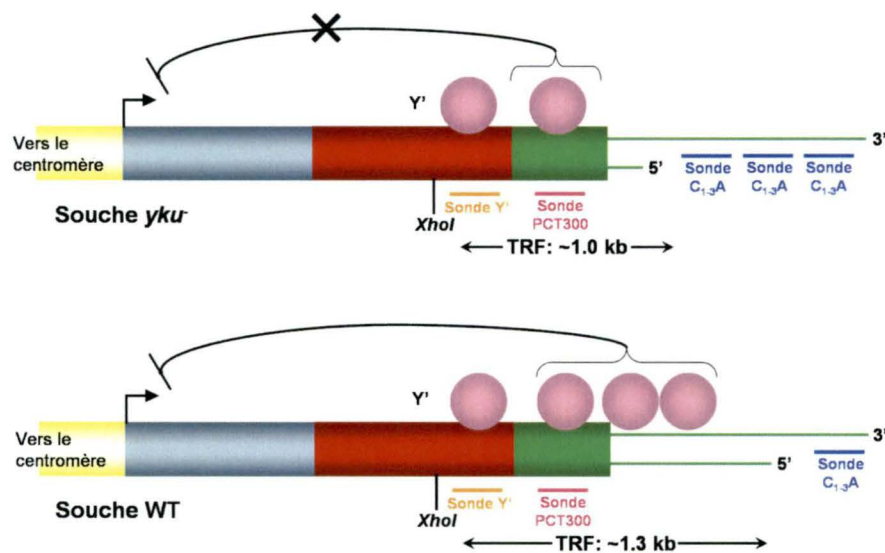
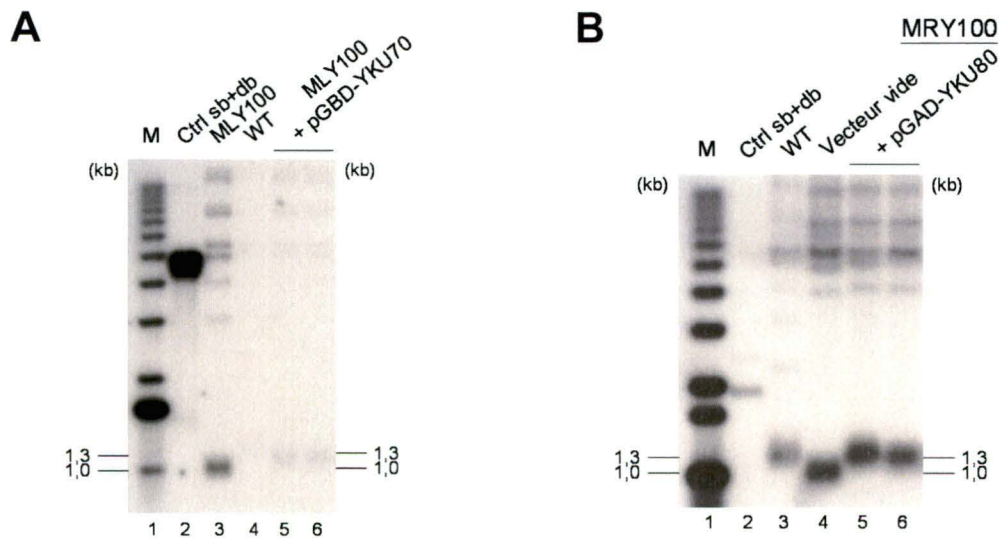


Figure 6. Comparaison des phénotypes télomériques d'une souche *yku⁻* avec une souche de type sauvage.

Pour une souche *yku⁻* le TRF_{XhoI} observé est ~1.0 kb. Alors que dans une souche de type sauvage, il est ~1.3 kb. La transcription des gènes situés à proximité d'un télomère sera réprimée dans une souche de type sauvage (TPE « up »). Alors qu'elle ne le sera pas dans une souche *yku⁻* (TPE « down »). Le niveau de simple-brin télomérique d'une souche *yku⁻* sera très élevé comparativement à celui observé dans une souche de type sauvage. La sonde Y' s'hybride au niveau de l'élément sous-télomérique Y', alors que la sonde PCT300 s'hybride plutôt au niveau des répétitions télomériques. La sonde C1-3A s'hybride, quant à elle, au niveau de l'extension 3' simple-brin télomérique.

VALIDATION DES CONSTRUCTIONS UTILISÉES POUR LE CRIBLAGE DOUBLE-HYBRIDE

Les constructions utilisées ont tout d'abord été vérifiées par des tests de complémentation, tel que décrit dans la section matériel et méthodes. La figure 6 est une représentation des différents phénotypes observés dans une souche *yku⁻* en comparaison avec une souche de type sauvage. La construction pGBD-YKU70 a été introduite dans la souche MLY100, alors que le plasmide pGAD-YKU80 a été transformé dans la souche MRY100. Les constructions pGBD-YKU70/80 et pGBD-YKU80/70, quant à elles, ont été transformées dans la souche LRY100. Par la suite, afin d'analyser la structure terminale des télomères, un gel de télomères avec hybridation in-gel et/ou un buvardage de type Southern a été réalisé afin d'observer le simple-brin télomérique et/ou la longueur des télomères.



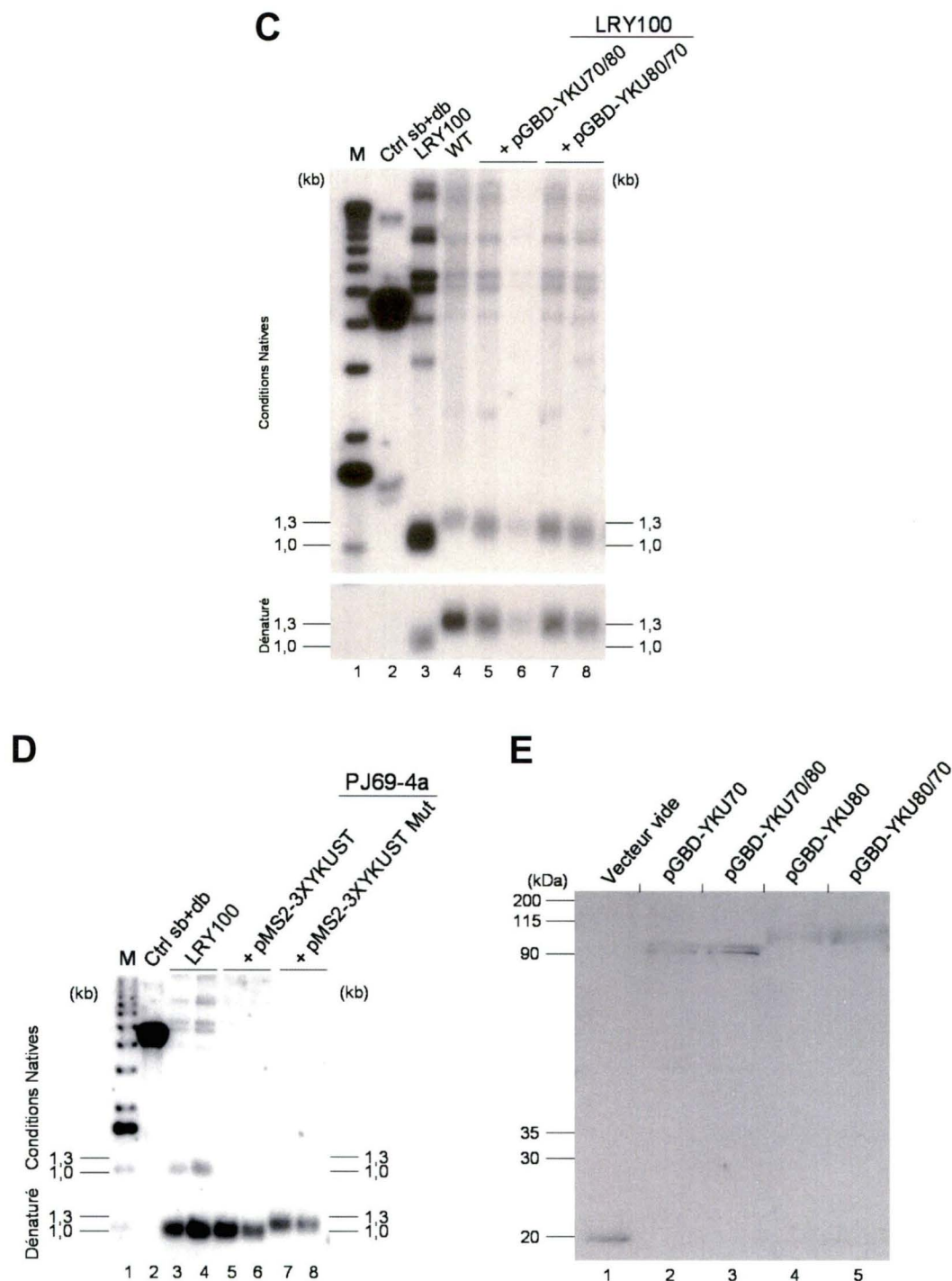


Figure 7. Validation des constructions utilisées dans le criblage double-hybride par tests de complémentation et immunobuvardage.

(A) Gel de télomères, en conditions natives, hybridé avec la sonde C₁₋₃A, validant la construction pGBD-YKU70. Le contenu des pistes est le suivant : marqueur de poids moléculaire 1kb ladder (piste 1), contrôle sb/db (piste 2), souche MLY100 (piste 3), souche WT PJ69-4a (piste 4), pGBD-YKU70 dans la souche MLY100 (pistes 5 et 6).

(B) Gel de télomères dénaturé et transféré à la Southern, puis hybridé avec la sonde Y' confirmant la fonctionnalité de la construction pGAD-YKU80. Le contenu des pistes est le suivant : marqueur de poids moléculaire 1kb ladder (piste 1), contrôle sb/db (piste 2), souche WT PJ69-4a (piste 3), vecteur pGAD-C3 vide dans la souche MRY100 (piste 4), pGAD-YKU80 dans la souche MRY100 (pistes 5 et 6).

(C) Gel de télomères, en conditions natives, hybridé avec la sonde C₁₋₃A, dénaturé et transféré à la Southern, puis hybridé avec la sonde Y', validant les constructions pGBD-YKU70/80 et pGBD-YKU80/70. Le contenu des pistes est le suivant : marqueur de poids moléculaire 1kb ladder (piste 1), contrôle sb/db (piste 2), souche LRY100 (piste 3), souche WT PJ69-4a (piste 4), pGBD-YKU70/80 dans la souche LRY100 (pistes 5 et 6), pGBD-YKU80/70 dans la souche LRY100 (pistes 7 et 8).

(D) Gel de télomères, en conditions natives, hybridé avec la sonde C₁₋₃A, dénaturé et transféré à la Southern, puis hybridé avec la sonde Y', validant les constructions pIIIEX-3XYKUST et pIIIEX-3XYKUST Mut. Le contenu des pistes est le suivant : marqueur de poids moléculaire 1kb ladder (piste 1), contrôle sb/db (piste 2), souche LRY100 (pistes 3 et 4), pIIIEX-3XYKUST dans la souche PJ69-4a (pistes 5 et 6), pIIIEX-3XYKUST Mut dans la souche PJ69-4a (pistes 7 et 8).

(E) Immunobuvardage de type Western vérifiant l'expression des protéines de fusion produites à partir des constructions pGBD-YKU70, pGBD-YKU80, pGBD-YKU70/80 et pGBD-YKU80/70. Le contenu des pistes est le suivant : pGBD-C3 vide (piste 1), pGBD-YKU70 (piste 2), pGBD-YKU70/80 (piste 3), pGBD-YKU80 (piste 4) et pGBD-YKU80/70 (piste 5).

À la figure 7, on peut voir que les constructions pGBD-YKU70 (Figure 7A, pistes 5 et 6) et pGAD-YKU80 (Figure 7B, pistes 5 et 6) permettent la complémentation du phénotype télomérique *yku*⁻ d'une souche n'ayant pas le gène *yku70* ou *yku80*, c'est-à-dire que le niveau de simple-brin télomérique et/ou la longueur des télomères correspond à ce qui est observé dans une souche de type sauvage. Il en est de même pour les constructions inverses qui permettent aussi cette complémentation (données non montrées). Les constructions pGBD-YKU70/80 (Figure 7C, pistes 5 et 6) et pGBD-YKU80/70 (Figure 7C, piste 7 et 8) permettent, elles aussi, la complémentation du

phénotype télomérique *yku⁻* d'une souche n'ayant pas les gènes *yku70* et *yku80*. En effet, lorsque ces constructions sont exprimées dans la souche LRY100 le niveau de simple-brin est plus faible que celui d'une souche *yku⁻* (Figure 7C, piste 3) et comparable à celui observé pour une souche de type sauvage (Figure 7C, piste 4). Quant à la longueur des télomères, elle est comparable à celle observée pour une souche de type sauvage (Figure 7C, piste 4), donc ceux-ci sont plus longs que ceux d'une souche *yku⁻* (Figure 7C, piste 3). L'expression des protéines de fusion produites par les différentes constructions a été testée (Figure 7E). Il s'avère que les protéines de fusion produites par les différentes constructions, soient pGBD-YKU70 (Figure 7E, piste 2), pGBD-YKU80 (Figure 7E, piste 4), pGBD-YKU70/80 (Figure 7E, piste 3) et pGBD-YKU80/70 (Figure 7E, piste 5), sont relativement bien exprimées, et ce, de façon complète, c'est-à-dire non tronquée.

Il a été démontré par le laboratoire du Dr. Daniel Gottschling (Peterson *et al.*, 2001) que lorsque la tige-boucle de 48 nt de *TLC1* qui est liée par Yku était surexprimée dans une souche de type sauvage (sous forme de trois copies placées en tandem), les phénotypes observés étaient les mêmes que pour les cellules *yku⁻*. Par exemple, le niveau de simple-brin télomérique était élevé et les télomères étaient courts. Afin de reproduire les résultats que ce groupe a obtenu et ainsi valider les constructions pIIIEX-3XYKUST et pIIIEX-3XYKUST Mut, celles-ci ont été introduites dans la souche PJ69-4a et la structure terminale des télomères a été analysée. On constate, à la figure 7D,

que les deux constructions semblent fonctionnelles et se comportent tel qu'attendu. En effet, le niveau de simple-brin télomérique est relativement élevé lorsque la tige-boucle de 48 nt de *TLC1* qui est liée par Yku est surexprimée dans une souche de type sauvage (Figure 7D, pistes 5 et 6). En fait, il s'avère être de niveau intermédiaire, c'est-à-dire plus faible que dans une cellule *yku⁻* (Figure 7D, pistes 3 et 4), mais plus élevé que dans une cellule de type sauvage. C'est au niveau de la longueur des télomères que l'on peut confirmer la fonctionnalité de la construction. En effet, on observe qu'en présence de la tige-boucle, les télomères sont courts (Figure 7D, pistes 5 et 6), comme ceux d'une souche *yku⁻* (Figure 7D, pistes 3 et 4). Lorsque cette tige-boucle contient les mutations empêchant sa formation adéquate, le niveau de simple-brin télomérique est au même niveau que celui de la souche de type sauvage (Figure 7D, pistes 7 et 8). Quant à la longueur des télomères, on observe qu'en présence de la tige-boucle mutée, ils sont plutôt normaux. Le TRF observé est approximativement de 1,3kb et donc plus grand que celui d'une souche *yku⁻* (Figure 7D, pistes 3 et 4).

CONTRÔLES

En se basant sur des interactions connues, certains contrôles ont été réalisés avant d'entreprendre le criblage. Ces contrôles sont effectués entre les protéines suivantes : p53 et l'antigène grand T de SV40 (Figure 8A), Sir4p et Yku (Figure 8B), ainsi qu'entre Yku70p et Yku80p (Figure 8C).

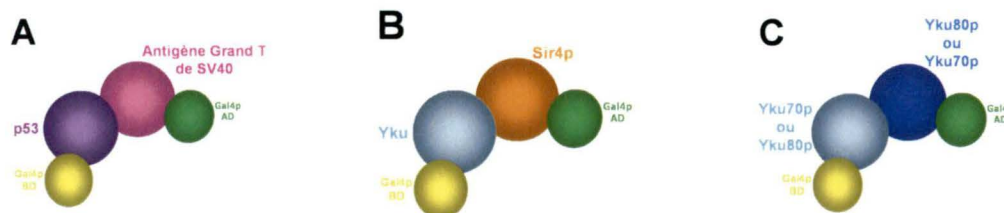


Figure 8. Représentation schématique des contrôles effectués préalablement au criblage double-hybride.

(A) Contrôle BD-p53 (pVA3) avec AD-antigène grand T de SV40 (pTD).
 (B) Contrôle BD-Yku avec AD-Sir4p.
 (C) Contrôle BD-Yku70p ou BD-Yku80p avec AD-Yku80p ou AD-Yku70p respectivement.

Il nous a alors été possible d'observer une croissance sur milieu sans histidine pour tous les contrôles effectués. Le contrôle effectué pour la souche en utilisant p53 et l'antigène grand T de SV40 a donné le résultat escompté, c'est-à-dire une bonne croissance sur milieux sans histidine ou adénine (Figure 9, colonne de gauche).

La croissance observée pour le contrôle entre Yku et Sir4p propose qu'une interaction entre ces protéines est détectable par double-hybride (Figure 9, colonne centrale). Par contre, la croissance observée semble très faible, n'étant observable qu'après sept jours d'incubation à 30°C. Ceci nous laisse croire que cette interaction, dans le contexte présent, ne serait pas très forte, mais plutôt faible.

Finalement, pour le contrôle effectué entre les deux sous-unités du complexe Yku, on observe aussi une croissance sur milieu sans histidine, proposant qu'une interaction entre Yku70p et Yku80p est, elle aussi, détectable par double-hybride (Figure 9, colonne de droite). On doit cependant mettre un bémol sur la force d'interaction observée, puisque la croissance est encore plus faible que celle qui fût observée pour le contrôle précédent.

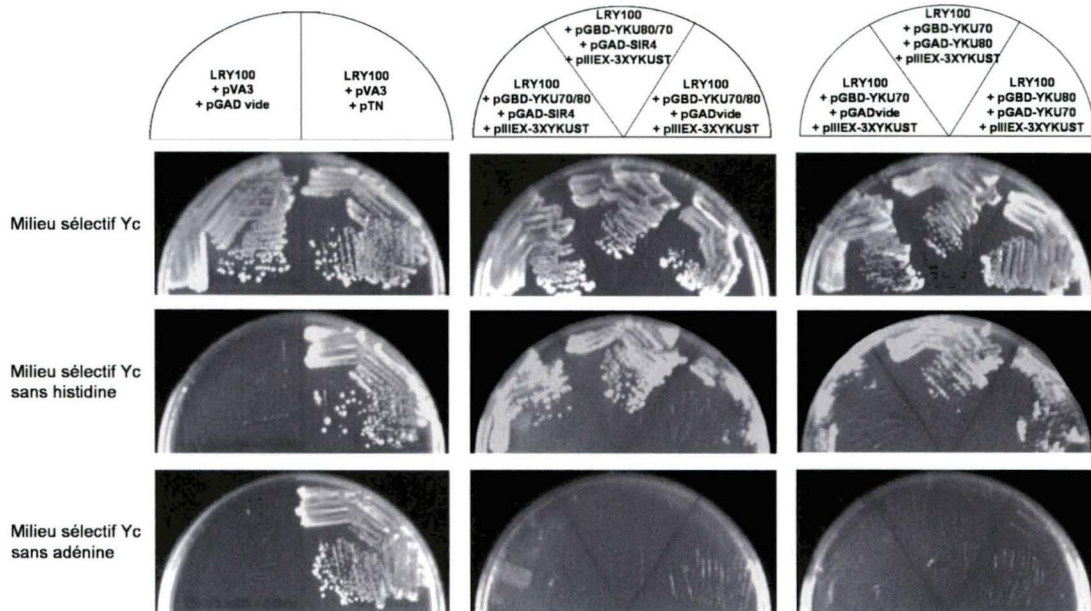


Figure 9. Croissance des contrôles du criblage double-hybride sur milieux sélectifs.

Dans la colonne de gauche se trouve le contrôle entre p53 et l'antigène grand T de SV40. Dans la colonne centrale, on observe la croissance du contrôle effectué entre Yku et Sir4p. Alors que dans la colonne de droite, on retrouve le contrôle effectué entre les deux sous-unités du complexe Yku. La construction pIIIE-3XYKUST est exprimée dans la souche, à l'exception du contrôle entre p53 et l'antigène grand T de SV40, afin que les contrôles soient réalisés dans les mêmes conditions que le criblage. Les cellules sont striées parallèlement sur les milieux sélectifs suivants : YC-Trp-Leu(-Ura), YC-Trp-Leu(-Ura)-His (sans histidine) et YC-Trp-Leu(-Ura)-Ade (sans adénine).

PARTENAIRES DE YKU : CRIBLAGE RÉALISÉ EN DEUX PARTIES

Tel que mentionné précédemment, le criblage fût effectué en deux parties. Au tableau 5, on retrouve le nombre de clones ayant franchis chacune des étapes du criblage pour chacune de ces parties. La première partie du criblage fût réalisée avec la construction pGBD-YKU70/80. Le nombre total de transformants obtenus pour cette partie est de 3 022 750, et ce, pour les trois cadres de lecture. Le nombre de clones positifs obtenus après la transformation est de 155 et, au premier passage après la transformation, ce nombre a chuté à 21. Par contre, la majorité de ces clones ne montraient une croissance que sur milieu sélectif sans histidine et non sur milieu sélectif sans adénine. L'étape finale du criblage, consistant à isoler le plasmide de la librairie et à le réintroduire dans la souche de départ, a fait passer le nombre de clones positifs de 21 à 1. Ce clone, demeuré positif, est celui montré en exemple à la sous-section suivante.

La deuxième partie du criblage fût réalisée avec la construction pGBD-YKU80/70. Le nombre total de transformants obtenus pour les trois cadres de lecture est de 3 650 000. Le nombre de clones positifs obtenus au départ est de 102 et, au premier passage après la transformation, ce nombre a chuté à 42. Comme ce fût le cas pour la première partie du criblage, la majorité des clones ne poussaient que sur milieu sélectif sans histidine, sauf pour quatre de ces clones qui poussaient aussi bien sur milieu sélectif sans adénine que

sur milieu sélectif sans histidine. Cependant, l'étape finale a été catastrophique puisque aucun clone ne poussait sur les différents milieux après réintroduction.

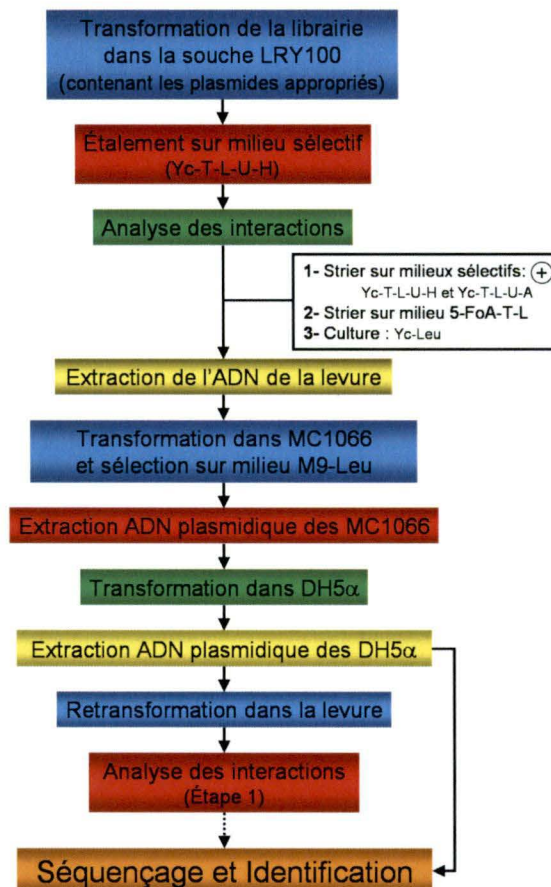


Figure 10. Étapes suivies lors du criblage double-hybride.

Le criblage de la librairie Y2HL est effectué, un cadre de lecture à la fois, en la transformant dans la souche LRY100 contenant les plasmides pGBD-YKU70/80 ou pGBD-YKU80/70 et pIIIEX-3XYKUST. Les interactions sont analysées sur milieux sélectifs YC-Trp-Leu-Ura-His et YC-Trp-Leu-Ura-Ade, puis on sélectionne pour la perte du plasmide pIIIEX-3XYKUST des clones positifs sur milieu FOA-Trp-Leu. Le clone est, par la suite, mis en culture pour en extraire l'ADN qui sera transformé dans les bactéries MC1066 par électroporation. Ces bactéries permettront la sélection et l'isolation du plasmide de la librairie pGAD-X. Le plasmide extrait des bactéries devra être transformé dans les bactéries DH5a, pour une meilleure efficacité de séquençage et de retransformation dans la levure. L'analyse des interactions suite à la retransformation se fait comme au départ.

Tableau 5. Progression du criblage, par double-hybride, des partenaires d'interaction de Yku.

Proie utilisée pour le criblage	Nombre de transformants	Au départ (Yc-T-L-U-H)	Après le 1er passage (Yc-T-L-U-H et/ou -A)	Après réintroduction (Yc-T-L-U-H)
pGBD-YKU70/80	3 022 750	155	21	1
pGBD-YKU80/70	3 650 000	102	42	4

*** Pour chacune des étapes suivies, on retrouve le nombre de clones qui passent à l'étape suivante, et ce, pour les deux parties du criblage.

Exemple d'un clone obtenu, le clone C3BD70-21

Tel que mentionné précédemment, le clone C3BD70-21 est le seul à avoir franchi toutes les étapes d'analyse du criblage et à être demeuré positif. Nous avons alors poussé l'analyse plus loin en analysant la dépendance des différentes constructions présentes dans la souche. Tout d'abord, on constate qu'il y a toujours croissance de ce clone sur milieu sélectif sans histidine, mais pas sur milieu sélectif sans adénine, et ce, indépendamment de la séquence de la tige-boucle surexprimée. En effet, on observe la même croissance pour les deux formes de tiges-boucles surexprimées (Figure 11, colonne de gauche). Il nous semblait alors que la croissance observée n'était pas dépendante de la tige-boucle, du moins de sa séquence. Nous avons alors enlevé la construction pIIIEX-3XYKUST de la souche pour confirmer que la croissance n'était pas dépendante de cette construction. Cette hypothèse s'est avérée juste. En effet, on constate que lorsque cette construction est absente de la souche, les cellules croissent toujours sur un milieu sans

histidine (Figure 11, colonne centrale). Par la suite, nous avons vérifié l'importance de la présence du complexe Yku sur la croissance. Nous avons observé qu'il n'importe pas que le complexe ou l'une ou l'autre des sous-unités soient présents pour qu'il y ait croissance (Figure 11, colonne centrale). Finalement, nous avons procédé au contrôle final pour s'assurer que nous n'avions pas un faux positif. Nous n'avons alors mis que le plasmide isolé de la librairie du clone C3BD70-21 dans la souche LRY100. Malheureusement, nous avons observé que le plasmide à lui seul était capable de permettre aux cellules de croître sur milieu sélectif sans histidine.

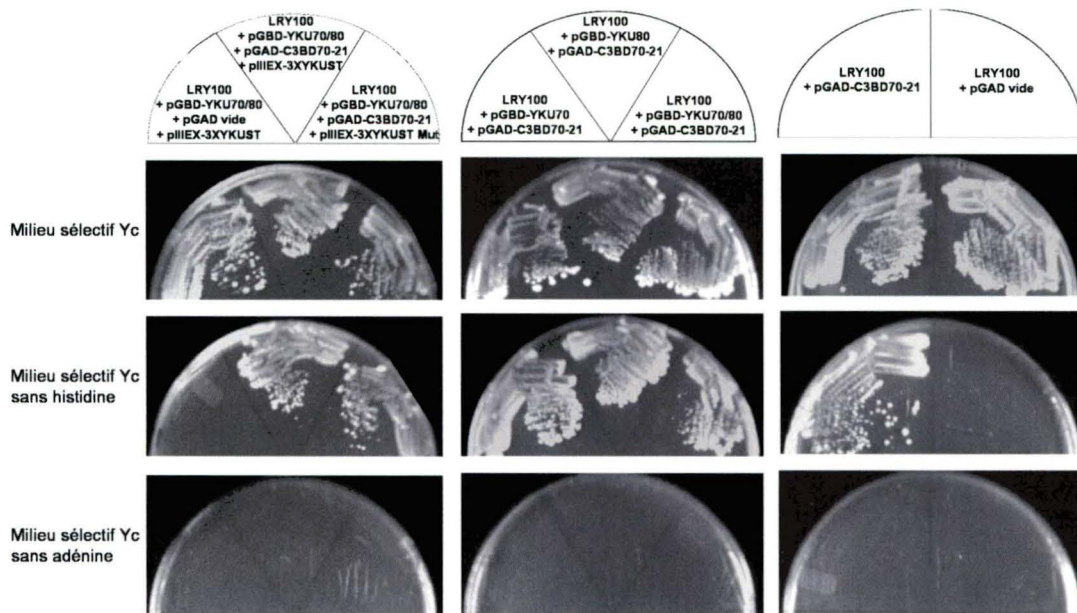


Figure 11. Exemple d'un clone montrant une interaction avec Yku, le clone C3BD70-21.

Dans la colonne de gauche, on retrouve la croissance observée lorsque toutes les constructions sont présentes. Les cellules sont striées parallèlement sur les milieux sélectifs suivants : YC-Trp-Leu-Ura, YC-Trp-Leu-Ura-His (sans histidine) et YC-Trp-Leu-Ura-Ade (sans adénine). Au centre, on observe la croissance lorsque le plasmide pIIIEX-3XYKUST est retiré de la souche. Les cellules sont alors striées parallèlement sur les milieux sélectifs

suivants: YC-Trp-Leu, YC-Trp-Leu-His (sans histidine) et YC-Trp-Leu-Ade (sans adénine). Dans la colonne de droite, on observe la croissance lorsqu'il ne reste que la construction pGAD-C3BD70-21. Les cellules sont striées parallèlement sur les milieux sélectifs suivants : YC-Leu, YC-Leu-His (sans histidine) et YC-Leu-Ade (sans adénine).

RÔLE DES SOUS-UNITÉS DU COMPLEXE YKU AUX TÉLOMÈRES

Les fonctions du complexe Yku au niveau du maintien des télomères et du TPE ont toujours été étudiées dans son ensemble. L'implication de chacune des sous-unités de l'hétérodimère n'est pas connue. En fait, il n'est pas clair si les rôles attribués au complexe peuvent être ou sont exercés par l'une ou l'autre des sous-unités ou si le complexe est requis. Il serait possible que la formation du complexe ne soit requise que pour son recrutement à l'ADN double-brin et aux télomères. Toujours dans le but de mieux comprendre le fonctionnement du complexe Yku, nous avons voulu répondre à la question suivante : si l'une ou l'autre des sous-unités avait la possibilité d'être présente aux télomères, est-ce qu'elle serait en mesure d'effectuer une fonction particulière sans que l'autre ne soit présente? Pour y répondre nous avons ciblé les sous-unités du complexe Yku individuellement à un télomère. La stratégie employée est illustrée à la figure 12. Nous avons utilisé les mêmes constructions que celles employées pour le criblage double-hybride, soient pGBD-YKU70, pGBD-YKU80, pGBD-YKU70/80 et pGBD-YKU80/70. Les différentes protéines de fusion produites pourront se lier à proximité du

télomère marqué *URA3* au niveau de la séquence *UASg* présente en aval de ce dernier. Le télomère marqué *ADE2* sert, quant à lui, de contrôle. De cette façon, il nous sera possible d'observer le TPE et les phénotypes télomériques (simple-brin et longueur des télomères) pour ces deux télomères et les comparer.

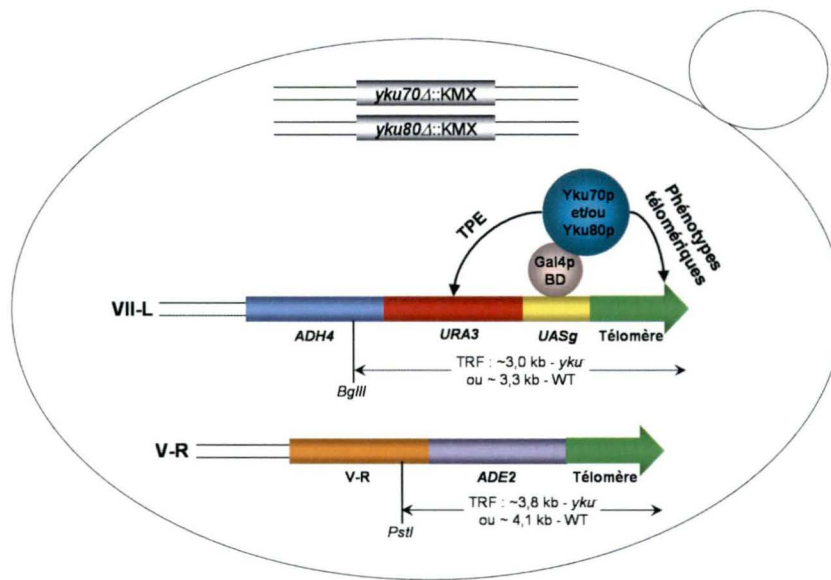


Figure 12. Stratégie utilisée pour analyser les fonctions des sous-unités de Yku aux télomères.

Les chromosomes VII-L et V-R de la souche LRY100 sont marqués respectivement, *UASg-URA3* et *ADE2*. Les constructions pGBD-YKU70, pGBD-YKU80, pGBD-YKU70/80 et pGBD-YKU80/70 sont utilisées pour aller cibler la ou les sous-unité(s) au télomère marqué *UASg-URA3*. Le TPE, le niveau de simple-brin et la longueur des télomères peuvent alors être analysés. Le TRF relâché, de la souche LRY110, avec l'enzyme *BglII* pour le Chr.VII-L::*UASg-URA3* est d'approximativement 3,0 kb, alors que celui relâché avec *PstI* pour le Chr.V-R::*ADE2* est approximativement de 3,8 kb.

VÉRIFICATION DU TPE

Nous avons d'abord observé l'état du TPE au niveau du télomère marqué *ADE2* par la coloration des cellules sur milieu YC contenant une très faible concentration d'adénine. Les cellules ayant un TPE normal, soit de type sauvage, auront une coloration rouge, puisque la transcription de *ADE2* sera réprimée. Les cellules ayant un TPE diminué, comme c'est le cas dans les cellules *yku⁻*, auront quant à elles une coloration blanche, puisque *ADE2* sera transcrit et que la voie de synthèse de l'adénine sera rétablie. Tel qu'observé à la figure 13, les cellules *yku⁻* ayant un TPE diminué auront une coloration blanche au départ, de même que le contrôle avec le vecteur pGBD vide. Mais, elles deviendront rouges lorsque les deux sous-unités seront exprimées dans la cellule. Lorsque seulement Yku70p ou Yku80p est présente dans la cellule, on remarque que les cellules demeurent blanches indiquant que le TPE demeure diminué, donc à l'état initial de la souche utilisée. Cela signifie qu'une sous-unité, à elle seule, ne peut lier le télomère, alors qu'aucune séquence forçant sa liaison n'est présente. Ceci confirme les hypothèses levées dans la littérature.

Pour ce qui est du télomère marqué *URA3* et comportant la séquence *UASg*, on observe l'état du TPE au niveau de ce télomère par la croissance ou non des cellules sur milieu contenant du 5-FOA. Dans les cellules exprimant *URA3*, le 5-FOA est converti subséquemment en

fluorodésoxyuridine, un produit inhibant la thymidylate synthétase. Ceci mènera à la mort des cellules pouvant effectuer cette conversion. Alors, les cellules ayant un TPE normal, soit de type sauvage, pousseront sur un tel milieu, puisque la transcription de *URA3* sera réprimée. Les cellules ayant un TPE diminué auront quant à elles beaucoup de difficulté ou seront incapables de croître sur milieu contenant du 5-FOA, puisque *URA3* sera transcrit. De cette façon, les cellules *yku⁻* ne pourront pas croître sur un tel milieu, alors qu'elles le pourront lorsque les deux sous-unités seront exprimées dans la cellule. C'est ce que l'on observe à la figure 13. Sur cette même figure, on s'aperçoit aussi que la présence de seulement Yku70p ou Yku80p dans la cellule ne permet pas aux cellules de croître sur milieu 5-FOA, indiquant que le TPE n'est pas rétabli et demeure donc à l'état *yku⁻*. Ce résultat a été confirmé par croissance ou non sur milieu sélectif sans uracile, où la croissance observée, telle qu'attendue, est à l'opposé de celle observée sur milieu 5-FOA.

Ces résultats nous permettent de croire qu'une sous-unité du complexe Yku, à elle seule, serait incapable d'assurer la fonction de répression de la transcription de gènes situés à proximité des télomères. En effet, il semble nécessaire que les deux sous-unités soient présentes pour que cette fonction soit accomplie. Il est à noter que pour la construction pGBD-YKU80/70, le clone A ne démontre pas le même patron de croissance que l'autre clone employé. Nous avons donc réalisé des tests de complémentation et vérifié

l'expression protéique de cette construction, pour ainsi confirmer qu'il y avait bel et bien un problème d'expression (Données non montrées). Les résultats pour ce clone n'ont donc pas été retenus, et ce, pour le TPE, le niveau de simple-brin télomérique et la longueur des télomères.

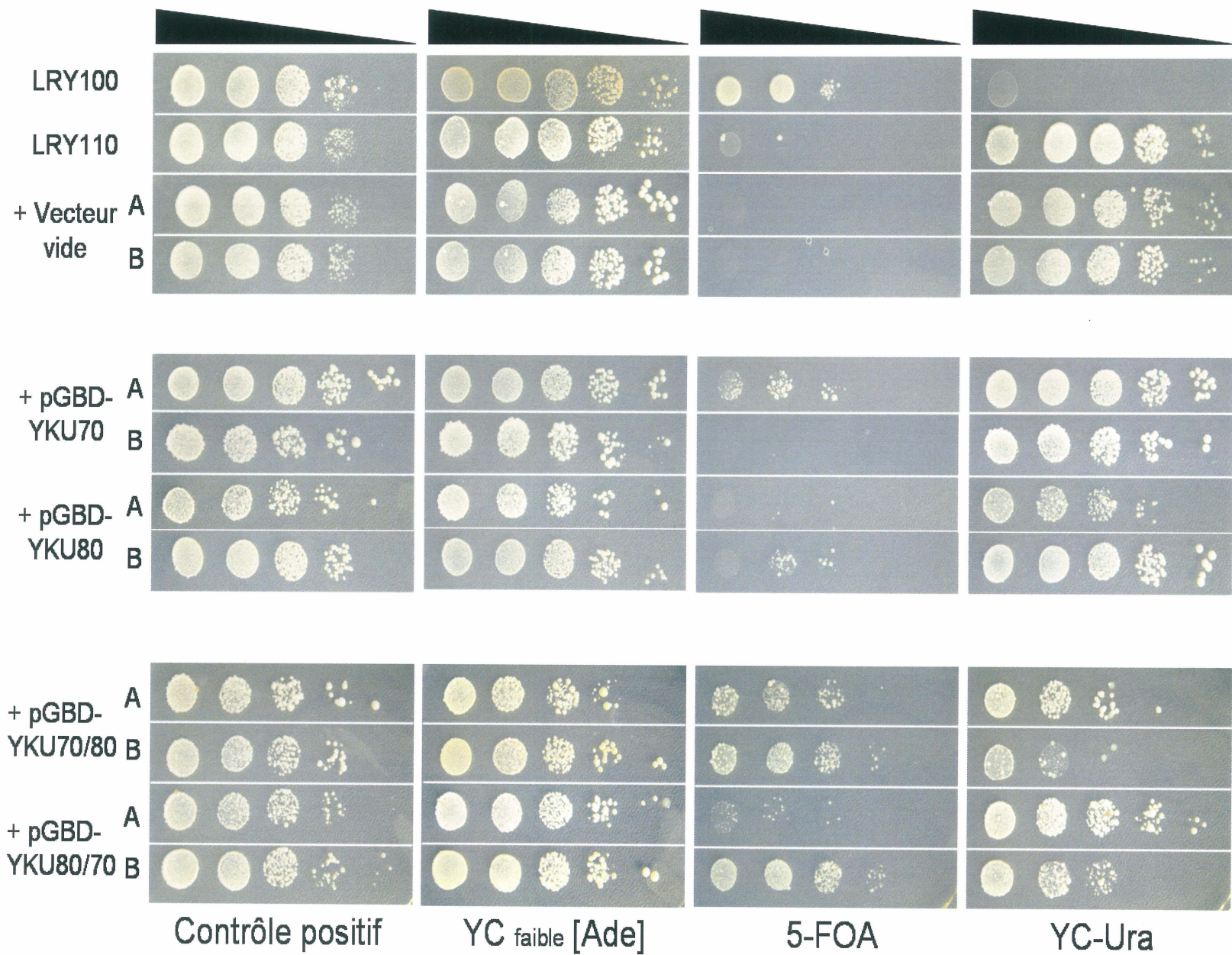


Figure 13. TPE exercé par les sous-unités de l'hétérodimère Yku ciblées à un télomère particulier.

Les cellules sont déposées sur les différents milieux sélectifs par dilution en série (« spot tests »). Ces milieux sont les suivants, en partant de la gauche vers la droite: YC-Trp (ou YEPD) constituant le contrôle positif, YC-Trp (ou YC complet) contenant une faible concentration d'adénine (low Ade), 5-FOA-Trp (ou 5-FOA complet) et YC-Trp-Ura (ou YC-Ura). La quantité de cellules déposées par point suit une échelle logarithmique allant de 100 000 à 10 cellules. Le TPE exercé sur le Chr.V-R::ADE2 est visualisé sur milieu sélectif avec faible concentration d'adénine, alors que celui exercé sur le Chr.VII-L::UASg-URA3 est observé, en parallèle, sur milieu sélectif contenant du 5-FOA et sur milieu sélectif sans uracile.

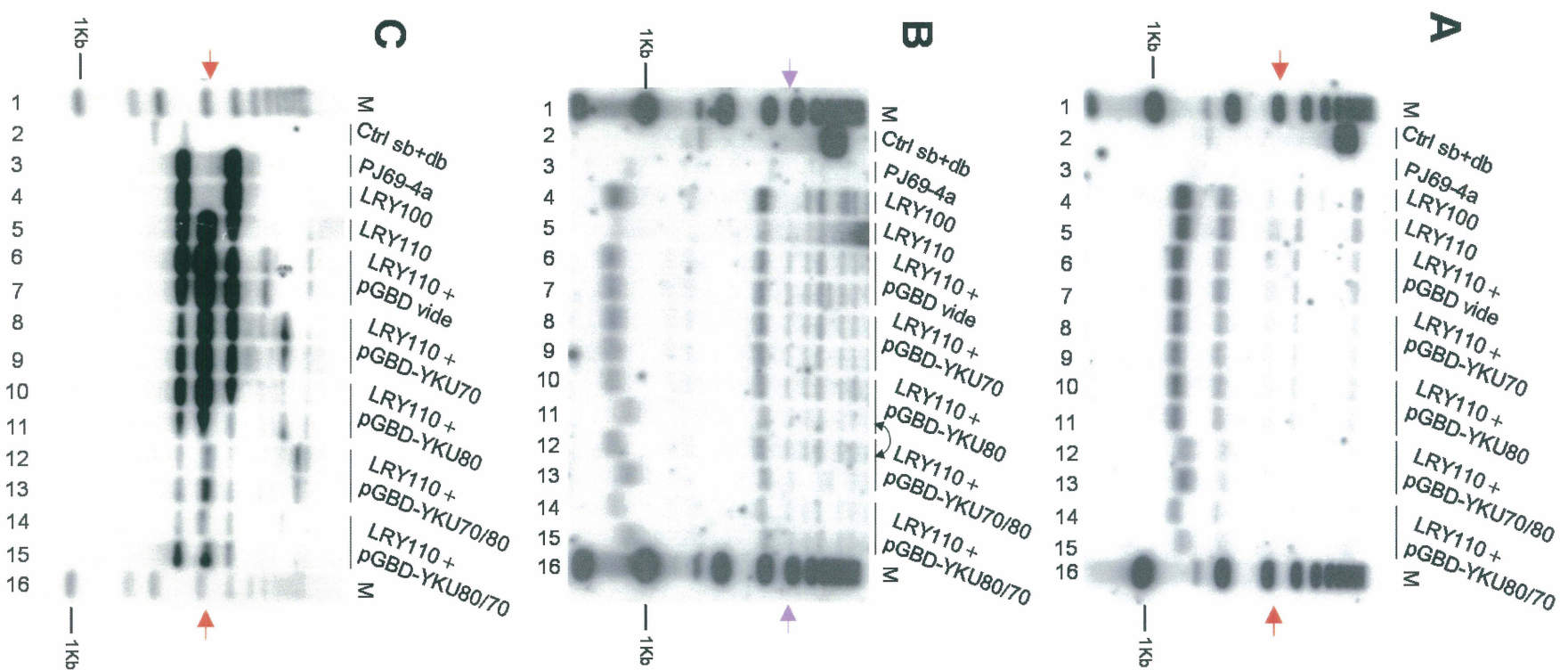
NIVEAU DE SIMPLE-BRIN TÉLOMÉRIQUE

Au niveau du télomère marqué ADE2, le TRF relâché avec *PstI* est approximativement de 3,8 kb, alors que pour le télomère marqué UASg-URA3, le TRF relâché avec *BglII* est d'environ 3,0 kb. Le niveau de simple-brin télomérique de ces ADN digérés fût évalué par hybridation in-gel. Selon les résultats obtenus à la figure 14, les deux sous-unités du complexe seraient requises pour que le simple-brin télomérique soit rétabli au niveau observé dans une souche de type sauvage. En effet, lorsque seulement Yku70p (Figure 14A, pistes 8 et 9) ou Yku80p (Figure 14A, pistes 10 et 11) est ciblé au chromosome marqué UASg-URA3 le niveau de simple-brin télomérique demeure semblable à celui de la souche LRY110 avec le vecteur vide (Figure 14A, pistes 6 et 7), alors que lorsque les deux protéines sont exprimées dans la cellule (Figure 14A, pistes 12-15), le niveau de simple-brin télomérique est rétabli à un niveau de type sauvage (Figure 14A, piste 3). De plus, pour le chromosome marqué ADE2 (Figure 14C) le niveau de simple-

brin observé semble le même pour toutes les conditions étudiées. Il ne semble donc pas y avoir de différence majeure entre les différents niveaux de simple-brin pour les deux chromosomes marqués.

LONGUEUR DES TÉLOMÈRES

Les gels de télomères analysés précédemment furent par la suite dénaturés et transférés sur membranes hybridées, par la suite, avec différentes sondes pour évaluer la longueur des télomères des chromosomes marqués. Tel que nous l'avions observé au niveau du TPE et du simple-brin télomérique, il semble que les deux sous-unités du complexe Yku soient requises pour que la longueur des télomères d'une souche *yku⁻* soit rétablie à la taille de ceux d'une souche de type sauvage. Tel qu'observé à la figure 14B, lorsque seulement Yku70p (Figure 14B, pistes 8 et 9) ou Yku80p (Figure 14B, pistes 10 et 11) est ciblé au chromosome marqué *UASg-URA3*, la taille du TRF obtenu est sensiblement la même que celle de la souche LRY110 (Figure 14B, piste 5), soit approximativement 3,0 kb. Par contre, lorsque l'hétérodimère est exprimé dans la cellule *yku⁻* (Figure 14B, pistes 12-15), la taille du TRF observée est plutôt de 3,3 kb, soit la taille que l'on observerait dans une souche de type sauvage (Figure 14B, piste 3). De plus, on observe les mêmes variations de taille pour les deux chromosomes marqués (Figures 14B et D).



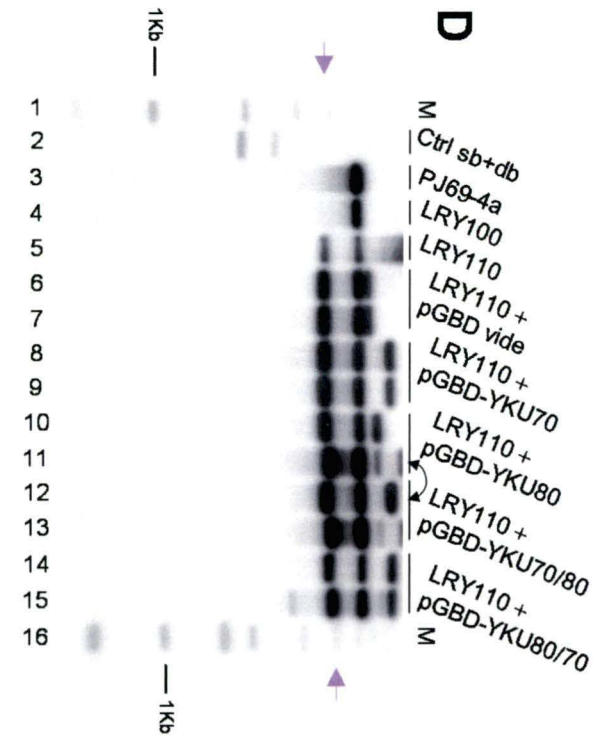
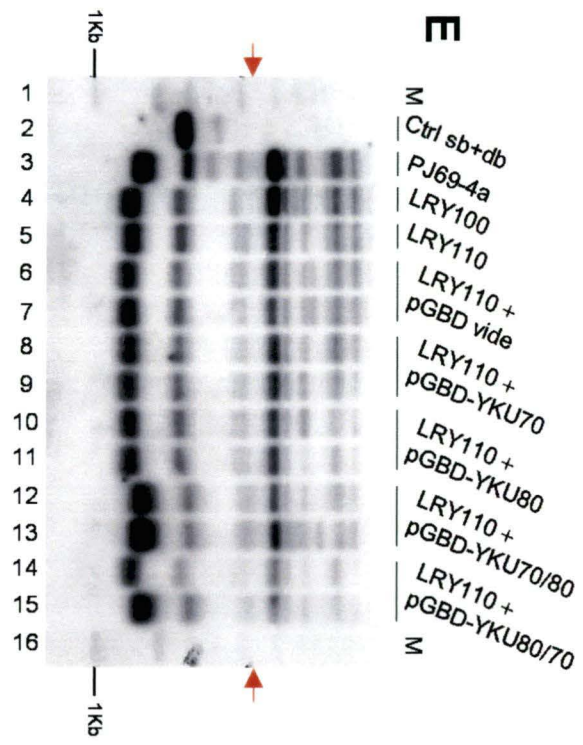
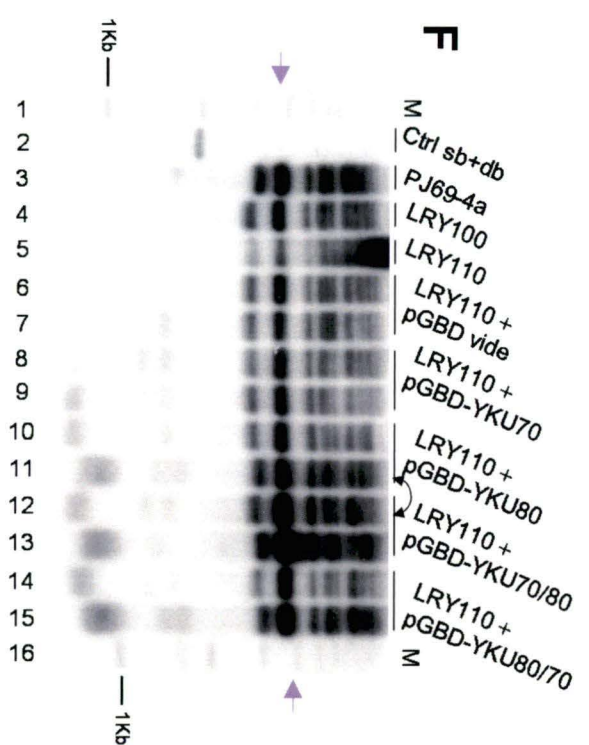


Figure 14. Phénotypes télomériques observés lorsque les sous-unités de Yku sont ciblées à un télomère particulier.

(A) Gel de télomères, en conditions natives, hybridé avec la sonde C₁₋₃A, ADN_g digéré *Bgl*III. Le contenu des pistes est le suivant : marqueur de poids moléculaire 1kb ladder (pistes 1 et 16), contrôle sb/db (piste 2), souche WT PJ69-4a (piste 3), souche LRY100 (piste 4), souche LRY110 (piste 5), pGBD vide dans la souche LRY110 (pistes 6 et 7), pGBD-YKU70 dans la souche LRY110 (pistes 8 et 9), pGBD-YKU80 dans la souche LRY110 (pistes 10 et 11), pGBD-YKU70/80 dans la souche LRY110 (pistes 12 et 13), pGBD-YKU80/70 dans la souche LRY110 (pistes 14 et 15).

(B) Gel de télomères, en conditions natives, hybridé avec la C₁₋₃A, ADN_g digéré *Pst*I. Le contenu des pistes est le suivant : marqueur de poids moléculaire 1kb ladder (pistes 1 et 16), contrôle sb/db (piste 2), souche WT PJ69-4a (piste 3), souche LRY100 (piste 4), souche LRY110 (piste 5), pGBD vide dans la souche LRY110 (pistes 6 et 7), pGBD-YKU70 dans la souche LRY110 (pistes 8 et 9), pGBD-YKU80 dans la souche LRY110 (pistes 10 et 12), pGBD-YKU70/80 dans la souche LRY110 (pistes 11 et 13), pGBD-YKU80/70 dans la souche LRY110 (pistes 14 et 15).

(C) Gel de télomères en (A), dénaturé et transféré à la Southern, puis hybridé avec la sonde URA3.

(D) Gel de télomères en (B), dénaturé et transféré à la Southern, puis hybridé avec la sonde ADE2.

(E) Membrane en (C), dénaturée, puis hybridé avec la sonde PCT300.

(F) Membrane en (D), dénaturée, puis hybridé avec la sonde PCT300.

IDENTIFICATION DES PARTENAIRES DE *TLC1* PAR TRIPLE-HYBRIDE

Ce n'est qu'en 2004 qu'une structure secondaire de l'ARN de la télomérase de levure, *TLC1*, a été proposée par différents groupes dont celui de (Dandjinou *et al.*, 2004) (Figure 2). À première vue, certaines régions qui n'avaient pas été caractérisées auparavant et d'autres qui l'avaient très peu été, semblaient avoir une certaine importance au niveau de l'ARN, voire même au niveau de la formation de l'holoenzyme en soit. C'est pourquoi nous

avons voulu déterminer si le complexe de la télomérase comptait d'autres protéines que celles déjà connues. Pour ce faire, nous avons utilisé le triple-hybride comme approche. Puisque *TLC1* est un ARN relativement grand, il n'était pas judicieux d'utiliser l'ARN entier à titre de proie. Certaines équipes de chercheurs ayant effectué de tels criblages avaient noté qu'un ARN de 200 nt était la taille maximale à utiliser (Sengupta *et al.*, 1999). L'utilisation d'un ARN trop grand aurait pour effet de générer trop de clones positifs qui sont ensuite difficilement analysables, rendant quasiment impossible l'identification des vrais positifs parmi le nombre important de faux positifs. C'est pourquoi nous avons décidé de décortiquer l'ARN afin d'effectuer le criblage sur une courte portion de l'ARN à la fois. La première partie du criblage a été effectuée avec la portion 3' de l'ARN (Figure 2, encadré bleu), c'est-à-dire la tige-boucle VII, à laquelle la portion 5' de l'ARN comprenant le site Sm a été conservée pour s'assurer du bon repliement de l'ARN. La construction utilisée s'appelle pMS2-3'ST. Nous avons décidé d'entreprendre le criblage avec cette portion de l'ARN puisqu'il nous semblait quasiment impossible qu'une telle structure cruciforme au sein d'un ARN ne soit laissée nue dans la cellule. De plus, il a été démontré que cette partie de l'ARN *TLC1* formant la structure cruciforme au niveau de l'hélice VII de la structure proposée par (Dandjinou *et al.*, 2004), serait essentielle pour l'activité de la télomérase et la survie cellulaire (Zappulla et Cech, 2004). En outre, certains travaux présentement en cours dans le laboratoire sont dirigés vers la compréhension des processus de maturation de l'ARN de la télomérase de levure. La présence du site Sm au

niveau de la portion distale en 3' de l'ARN TLC1 et la structure de cette portion semble proposer son rôle dans la maturation de l'ARN TLC1 et son transport. C'est pourquoi il semblait justifier d'effectuer la première partie du criblage avec cette portion de l'ARN de la télomérase.

VALIDATION DES CONSTRUCTIONS UTILISÉES POUR LE CIBLAGE TRIPLE-HYBRIDE

Les différentes constructions plasmidiques utilisées pour le criblage et pour les contrôles préliminaires ont d'abord été analysées pour s'assurer de leur fonctionnalité. Pour ce faire, la majorité des constructions a été vérifiée par tests de complémentation et immunobuvardage de type Western, tel que décrit dans la section matériel et méthodes. La construction pGAD-EST1 a été introduite dans la souche *MRY101* (issue de la souche TVL120 provenant du laboratoire du Dr. Vickie Lundblad) et complémentée par le plasmide pSLE14 de Mme. Stéphanie Larose. Tel qu'observé sur la figure 15A, la construction pGAD-EST1 utilisée semble permettre la complémentation d'une souche *est1Δ*, puisque les cellules croissent encore très bien après le passage à 100 générations sur le milieu sélectif. De plus, la longueur des télomères des souches exprimant la protéine de fusion est normale (Figure 15C, pistes 11 et 13), c'est-à-dire semblable à une souche de type sauvage (Figure 15C, piste 3), et ce, après 100 générations. Il nous a aussi été possible de confirmer l'expression de cette protéine de fusion par immunobuvardage de type Western (Figure 15H, piste 5). On remarque, sur

les figures 15A et C, que la construction pGAD-EST1 #01 ne permet pas la complémentation de la souche *est1Δ*. C'est pourquoi elle n'a pas été utilisée. La construction utilisée est plutôt la pGAD-EST1 #04.

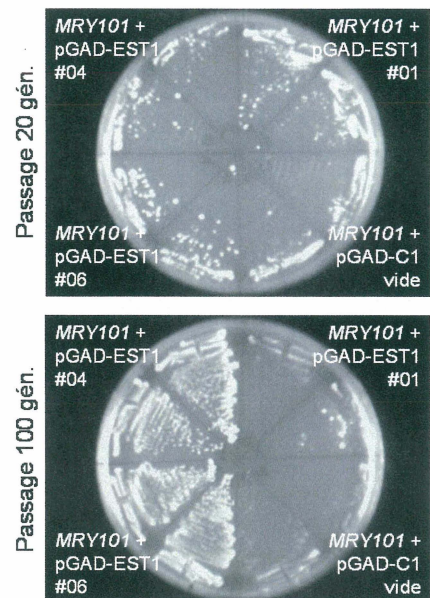
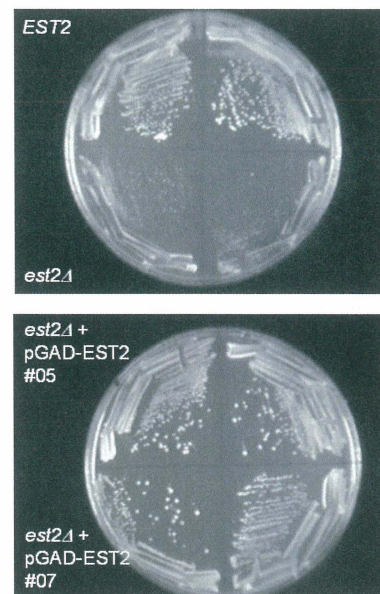
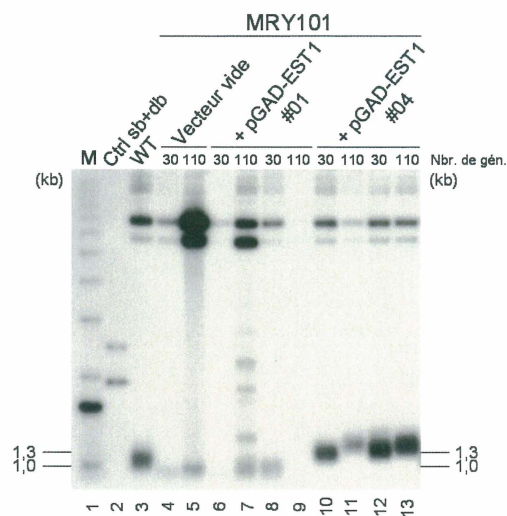
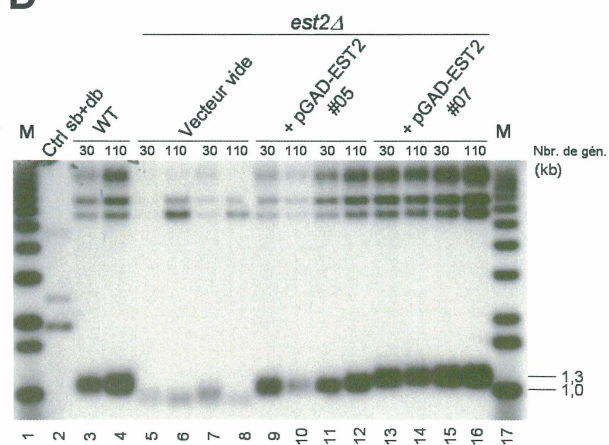
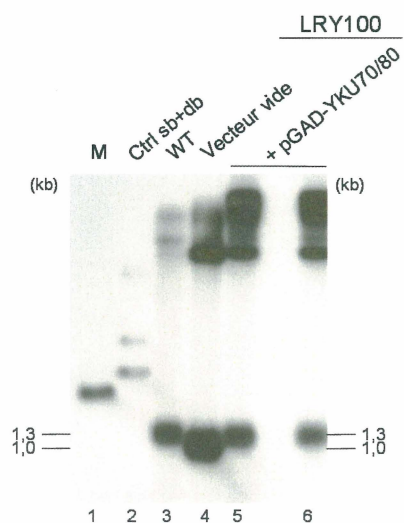
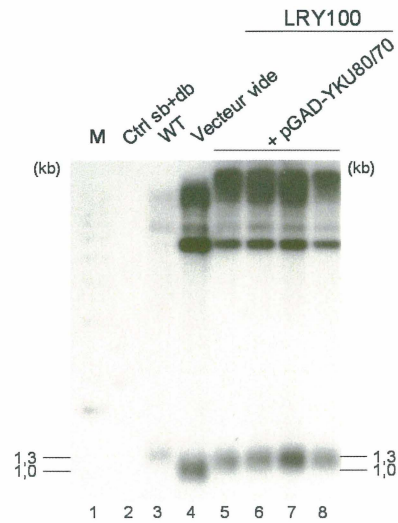
Le plasmide pGAD-EST2 a été transformé dans la souche *est2Δ*+pEST2 (provenant du laboratoire du Dr. Vickie Lundblad). Les cellules transformées ne semblent toujours pas entrées en sénescence après 100 générations (Figure 15B) et la longueur des télomères après 100 générations (Figure 15D, pistes 10 et 12) est comparable à celle d'une souche de type sauvage (Figure 15D, piste 4). Il nous a cependant été impossible d'observer l'expression des protéines par immunobuvardage de type Western (Figure 15H, piste 6). La construction utilisée est la pGAD-EST2 #05, mais la pGAD-EST2 #07 aurait aussi pu être utilisée.

Les constructions pGAD-YKU70/80 et pGAD-YKU80/70, quant à elles, ont été transformées dans la souche LRY100. Par la suite, nous avons analysé la structure terminale des télomères par buvardage de type Southern pour observer la longueur des télomères. Aux figures 15E et 15F respectivement, on observe que les constructions pGAD-YKU70/80 (Figure 15E, pistes 5 et 6) et pGAD-YKU80/70 (Figure 15F, pistes 5-8) permettent la complémentation du phénotype télomérique *yku⁻* d'une souche portant la délétion des gènes *yku70* et *yku80*, c'est-à-dire que la longueur des télomères est rétablie à celle observée dans une souche de type sauvage (Figures 15E

et 15F, piste 3). De plus, l'expression protéique de ces différentes constructions a été confirmée par immunobuvardage de type Western (Figure 15H, pistes 8 et 9 respectivement).

Finalement, afin de valider les constructions pMS2-1XKUST et pMS2-3XKUST, nous avons procédé comme pour le criblage double-hybride. Ces plasmides, permettant la surexpression de la tige-boucle de 48 nt de *TLC1* qui est liée par Yku (une ou trois copie(s)), ont alors été introduits dans la souche PJ69-4a. Par la suite, la longueur des télomères a été analysée. On observe, à la figure 15G, que les deux constructions se comportent tel qu'attendu, puisqu'en présence de la tige-boucle les télomères sont courts (Figure 15G, pistes 9-12), comparativement à une souche de type sauvage (Figure 15G, pistes 3 et 4).

Les autres constructions utilisées n'ont pas été validées par complémentation. Par contre, pour les constructions pMS2-EST1ST et pMS2-EST2ST, les contrôles montrés par la suite étaient fonctionnels. La seule construction qui n'a pas été validée est la pMS2-3'ST. Cependant, selon le programme *mfold*, le repliement hypothétique de l'hybride d'ARN serait adéquat. L'expression de l'ARN aurait pu être vérifiée par buvardage de type Northern et la fonctionnalité aurait pu être faite par Gelshift.

A**B****C****D****E****F**

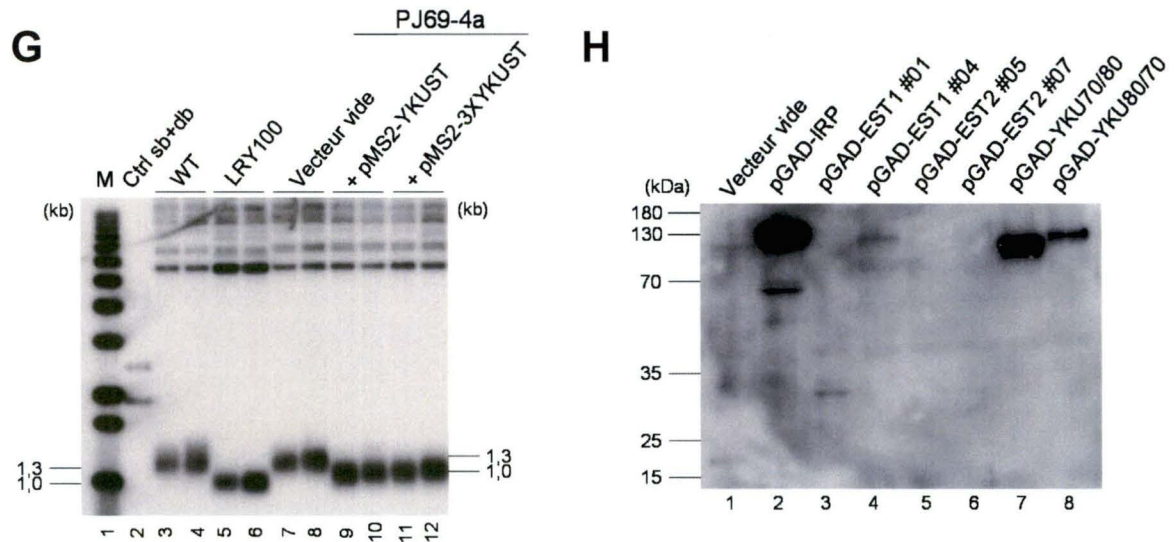


Figure 15. Validation des constructions utilisées dans le criblage triple-hybride par tests de complémentation et immunobuvardage.

(A) Test de complémentation des constructions pGAD-EST1 – Observation de la sénescence à 20 et 100 générations. On observe la sénescence du contrôle pGAD-C1 vide et de la construction pGAD-EST1#01 à 100 gén., alors que les constructions pGAD-EST1#04 et #06 complémentent bien.

(B) Test de complémentation des constructions pGAD-EST2 – Observation de la sénescence à 100 générations. On observe la sénescence de la souche *est2D* vide, alors que les constructions pGAD-EST2 #05 et #07 la complémentent bien.

(C) Gel de télomères dénaturé et transféré à la Southern, puis hybridé Y' confirmant la fonctionnalité d'une des deux constructions pGAD-EST1. Le contenu des pistes est le suivant : marqueur de poids moléculaire 1kb ladder (piste 1), contrôle sb/db (piste 2), souche WT PJ69-4a (piste 3), vecteur pGAD-C1 vide dans la souche MRY100 – 30 gén. (piste 4), vecteur pGAD-C1 vide dans la souche MRY100 – 110 gén. (piste 5), pGAD-EST1 #01 dans la souche MRY100 – 30 gén. (pistes 6 et 8), pGAD-EST1 #01 dans la souche MRY100 – 110 gén. (pistes 7 et 9), pGAD-EST1 #04 dans la souche MRY100 – 30 gén. (pistes 10 et 12), pGAD-EST1 #04 dans la souche MRY100 – 110 gén. (pistes 11 et 13).

(D) Gel de télomères dénaturé et transféré à la Southern, puis hybridé Y' confirmant la fonctionnalité des constructions pGAD-EST2. Le contenu des pistes est le suivant : marqueur de poids moléculaire 1kb ladder (piste 1), contrôle sb/db (piste 2), souche WT PJ69-4a (piste 3), vecteur pGAD-C1 vide dans la souche *est2D* – 30 gén. (pistes 4 et 6), vecteur pGAD-C1 vide dans la souche *est2D* – 110 gén. (pistes 5 et 7), pGAD-EST2 #05 dans la souche *est2D* – 30 gén. (pistes 8 et 10), pGAD-EST2 #05 dans la souche *est2D* – 110 gén. (pistes 9 et 11), pGAD-EST2 #07 dans la souche *est2D* – 30 gén. (pistes 12 et 14) et pGAD-EST2 #07 dans la souche *est2D* – 110 gén. (pistes 13 et 15).

(E) Gel de télomères dénaturé et transféré à la Southern, puis hybridé Y', validant les constructions pGAD-YKU70/80. Le contenu des pistes est le suivant : marqueur de poids moléculaire 1kb ladder (piste 1), contrôle sb/db (piste 2), souche WT PJ69-4a (piste 3), vecteur pGAD-C1 vide dans la souche LRY100 (piste 4) et pGAD-YKU70/80 dans la souche LRY100 (pistes 5 et 6).

(F) Gel de télomères dénaturé et transféré à la Southern, puis hybridé Y', validant les constructions pGAD-YKU80/70. Le contenu des pistes est le suivant : marqueur de poids moléculaire 1kb ladder (piste 1), contrôle sb/db (piste 2), souche WT PJ69-4a (piste 3), vecteur pGAD-C1 vide dans la souche LRY100 (pistes 4) et pGAD-YKU80/70 dans la souche LRY100 (pistes 5-8).

(G) Gel de télomères, en conditions natives, avec hybridation C₁₋₃A, dénaturé et transféré à la Southern, puis hybridé Y', validant les constructions pMS2-YKUST et pMS2-3XYKUST Mut. Le contenu des pistes est le suivant : marqueur de poids moléculaire 1kb ladder (piste 1), contrôle sb/db (piste 2), souche WT PJ69-4a (pistes 3 et 4), souche LRY100 (pistes 5 et 6), pIII/MS2-2 dans la souche PJ69-4a (pistes 7 et 8), pMS2-YKUST dans la souche PJ69-4a (pistes 9 et 10) et pMS2-3XYKUST dans la souche PJ69-4a (pistes 11 et 12).

(H) Immunobuvardage de type Western vérifiant l'expression des protéines de fusion produites à partir des constructions pGAD-EST1, pGAD-EST2, pGAD-YKU70/80 et pGAD-YKU80/70. Le contenu des pistes est le suivant : marqueur de poids moléculaire Rainbow (piste 1), pGAD-C1 vide (piste 2), pGAD-IRP (piste 3), pGAD-EST1 #01 (piste 4), pGAD-EST1 #04 (piste 5), pGAD-EST2 #05 (piste 6), pGAD-EST2 #07 (piste 7), pGAD-YKU70/80 (piste 8) et pGAD-YKU80/70 (piste 9).

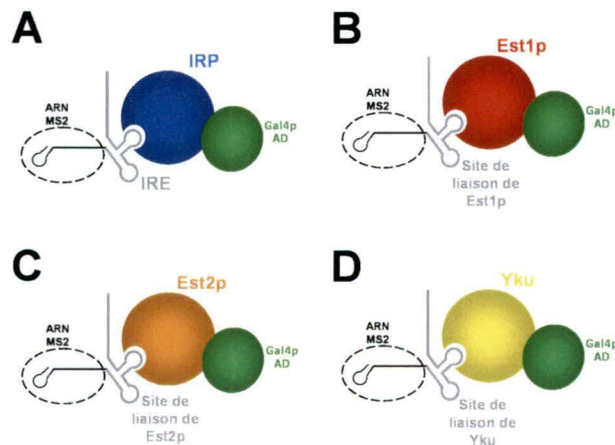


Figure 16. Représentation schématique des contrôles du criblage triple-hybride.

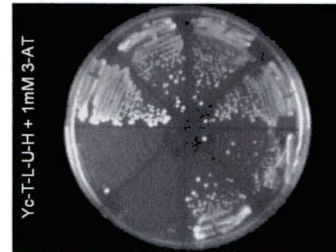
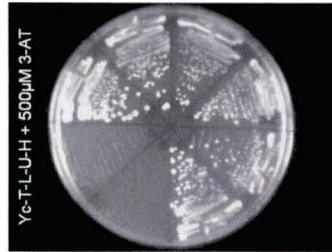
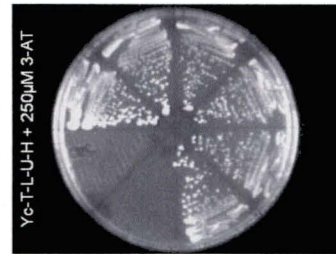
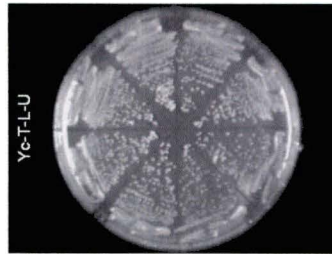
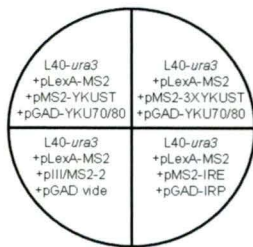
Contrôle validant la fonctionnalité de la souche utilisée, basé sur l'interaction entre (A) IRE et IRP. Vérification des interactions connues dans la littérature, soit (B) Est1p, (C) Est2p et (D) Yku avec la portion de *TLC1* qu'ils lient respectivement.

CONTRÔLES

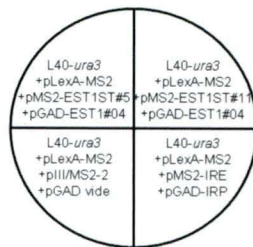
Tel que nous l'avons fait pour le criblage double-hybride, nous avons tout d'abord effectué les différents contrôles positifs nécessaires avant d'entreprendre le criblage. Ces contrôles sont, encore une fois, basés sur des interactions connues. Il était absolument nécessaire d'ajouter un composé nommé 3-AT aux milieux sélectifs sans histidines utilisés. Le 3-AT agit à titre d'inhibiteur compétitif de l'enzyme produit par le gène *HIS3*. Il sera donc nécessaire que les cellules produisent une quantité relativement importante d'histidine pour qu'elles puissent croître sur un milieu sans histidine contenant ce composé. Un test a été réalisé, au préalable, afin de déterminer la concentration de 3-AT à utiliser pour le criblage à l'aide du contrôle positif IRP-IRE. La concentration déterminée est de 250µM 3-AT. À la figure 16 sont illustrés les différents contrôles qui ont été effectués, soit IRP-IRE (A) qui constitue le contrôle positif utilisé lorsque la méthode a été développée (SenGupta *et al.*, 1996), ainsi que Est1p (B), Est2p (C) et Yku (D) avec la région de *TLC1* liées respectivement par ces différentes protéines (Figure 2). Il nous a alors été possible d'observer une croissance sur les milieux sans histidine contenant des concentrations croissantes de 3-AT, et ce, pour tous

les contrôles effectués (Figure 17). Cette croissance nous permet de prétendre qu'il est possible d'observer une interaction entre ces différentes protéines et l'ARN de la télomérase par triple-hybride, du moins pour les régions utilisées pour chacun des contrôles.

A



B



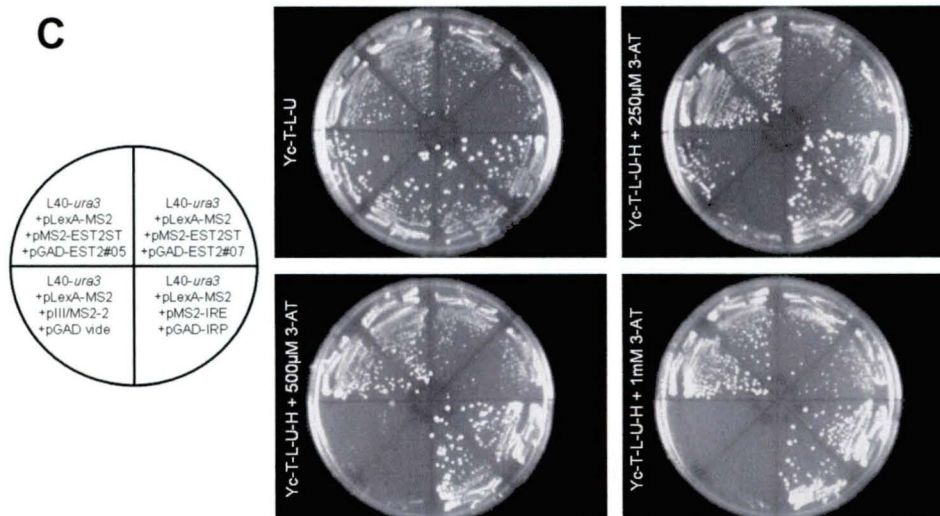


Figure 16. Croissance des contrôles du criblage triple-hybride sur milieux sélectifs.

(A) Croissance du contrôle entre le complexe Yku et la tige-boucle de 48 nt de *TLC1* qu'il lie, sous forme d'une ou trois copie(s).

(B) Croissance du contrôle effectué entre Est1p et la portion de *TLC1* qu'elle lie.

(C) Croissance du contrôle effectué entre Est2p et son site de liaison sur *TLC1*.

Deux clones indépendants sont présentés pour chacune des conditions étudiées. Sur chacun des Pétris a été strié le contrôle négatif avec les vecteurs pIII/MS2-2 et pGAD-C1 vides, ainsi que le contrôle positif entre IRP et IRE. Les cellules sont striées parallèlement sur les milieux sélectifs suivants: YC-Trp-Leu-Ura, YC-Trp-Leu-Ura-His+250µM 3-AT, YC-Trp-Leu-Ura-His+500µM 3-AT et YC-Trp-Leu-Ura-His+1mM 3-AT.

PARTENAIRES DE *TLC1* – 1^{ÈRE} PARTIE : CRIBLAGE AVEC LA PORTION 3' DE L'ARN

Tel que mentionné en prélude, le criblage complet des partenaires d'interaction de *TLC1* doit être fait en plusieurs parties, à cause de la trop grande taille de l'ARN. Mon travail a consisté à effectuer la première partie du criblage en utilisant la construction pMS2-3'ST. La figure 18 illustre les

différentes étapes suivies lors du criblage et de l'analyse des interactions. Les résultats obtenus à chacune de ces étapes sont présentés dans le tableau 6. Le nombre total de transformants obtenus pour ce criblage est de 3 711 750 pour les trois cadres de lecture. Suite à la transformation, 296 clones positifs ont été obtenus. Tous ces clones ont été striés sur milieu sélectif sans histidine contenant 250µM 3-AT. Seulement 234 clones étaient toujours positifs après ce passage. Nous avons alors poursuivi l'analyse en restreignant les clones positifs sur milieux sélectifs sans histidine, mais contenant différentes concentrations de 3-AT. Ce passage a fait diminuer le nombre de clones positifs à 105.

C'est alors que nous avons déterminé la dépendance de la présence du plasmide exprimant la proie sur la croissance observée. Le nombre de clones positifs, après passage sur milieu 5-FOA, est alors passé de 105 à 39. Cette étape n'avait pas été effectuée lors du criblage double-hybride pour Yku. Elle a été ajoutée à celui-ci pour éliminer un grand nombre de faux positifs comme nous l'avions obtenu dans le criblage précédent. Finalement, nous avons isolé le plasmide de la librairie et l'avons réintroduit dans la souche de départ. Les 39 clones qui étaient toujours positifs avant cette étape étaient majoritairement des clones qui avaient une croissance jusqu'à 1mM 3-AT. On observe toujours une telle croissance que pour 25 de ces clones. Tel que mentionné dans la section matériel et méthodes, l'insert de ces différents clones a, par la suite, été séquencé dans le but d'identifier le gène auquel il

correspond. On retrouve, dans le tableau 7, l'identité des clones positifs. L'analyse des séquences a révélée que pour seulement cinq clones, le cadre de lecture était respecté. Ces clones correspondent à *ARK2*, *GDA1*, *LYS2*, *NST1* et *SPP381*. Il sera question lors de la discussion de certains de ces clones.

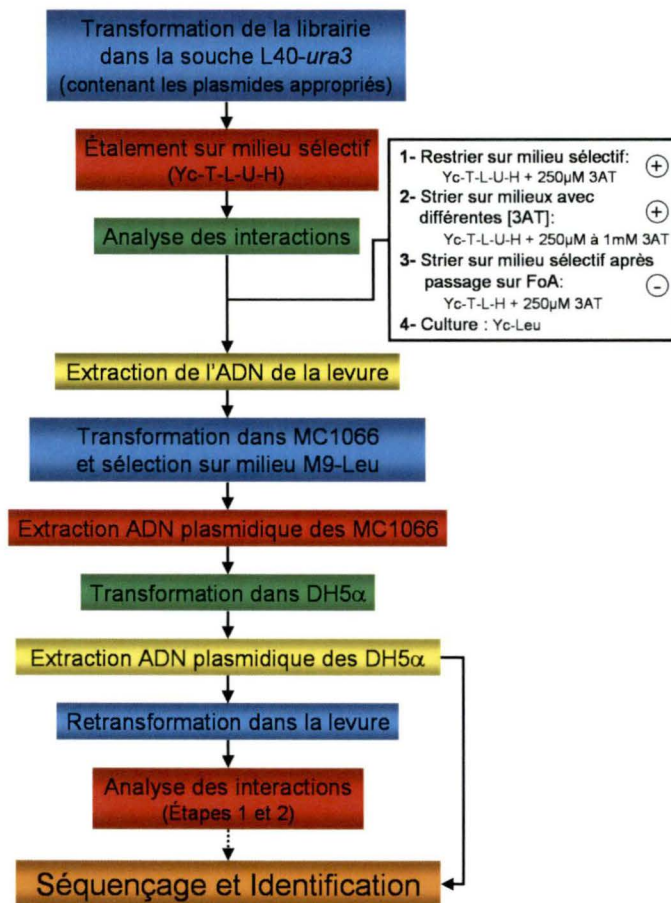


Figure 18. Étapes suivies lors du criblage triple-hybride.

Le criblage de la librairie Y2HL est effectué, un cadre de lecture à la fois, en la transformant dans la souche LRY100 contenant les plasmides pGBD-YKU70/80 ou pGBD-YKU80/70 et pIIIEX-3XYKUST. Les interactions sont analysées sur milieux sélectifs YC-Trp-Leu-Ura-His et YC-Trp-Leu-Ura-Ade, puis on sélectionne pour la perte du plasmide pIIIEX-3XYKUST des clones positifs sur milieu FOA-Trp-Leu. Le clone est, par la suite, mis en culture pour en extraire l'ADN qui sera transformé dans les bactéries MC1066 par

électroporation. Ces bactéries permettront la sélection et l'isolement du plasmide de la librairie pGAD-X. Le plasmide extrait des bactéries devra être transformé dans les bactéries DH5 α , pour une meilleure efficacité de séquençage et de retransformation dans la levure. L'analyse des interactions suite à la retransformation se fait comme au départ.

Tableau 6. Progression du criblage, par triple-hybride, des partenaires d'interaction de la portion 3' de l'ARN de la télomérase de levure.

Nombre de transformants		3 711 750
Au départ (Yc-T-L-U-H + 250 μ M 3-AT)		296
Après le 1er passage (Yc-T-L-U-H + 250 μ M 3-AT)		234
Après passage sur milieux avec différentes concentrations 3AT (Yc-T-L-U-H)	+ 250 μ M 3-AT	160
	+ 500 μ M 3-AT	130
	+ 1mM 3-AT	105
Après passage sur milieu 5-FoA (Yc-T-L-H + 250 μ M 3-AT)		39
Après réintroduction (Yc-T-L-U-H)	+ 250 μ M 3-AT	30
	+ 500 μ M 3-AT	29
	+ 1mM 3-AT	29

*** On retrouve le nombre de clones qui passent chacune des étapes suivies, tel qu'illustré à la figure 18.

Exemple de clones obtenus avec comme proie, pMS2-3'ST.

Les clones C1MS23'ST-29, C1MS23'ST-34 et C1MS23'ST-35 font partie de ceux ayant passé toutes les étapes de sélection et ayant montré une croissance sur milieu sélectif contenant jusqu'à 1mM 3-AT. On observe à la figure 18, la croissance de ces clones sur milieu sélectif contenant différentes concentrations de 3-AT, et ce, après réintroduction. On peut donc voir que

ces clones n'ont absolument pas de difficulté à croître sur de tels milieux. Les clones C1MS23'ST-34 et C1MS23'ST-35 ont par la suite été identifiés comme étant respectivement, YOR375W et *LYS2*, alors qu'il nous a été impossible d'identifier le clone C1MS23'ST-29, dû à un manque d'homologie. On observe aussi à la figure 18, que le clone C1MS23'ST-28 ne réussit pas à croître jusqu'à 1mM 3-AT après réintroduction. Celui-ci a été identifié comme étant *NTH1*.

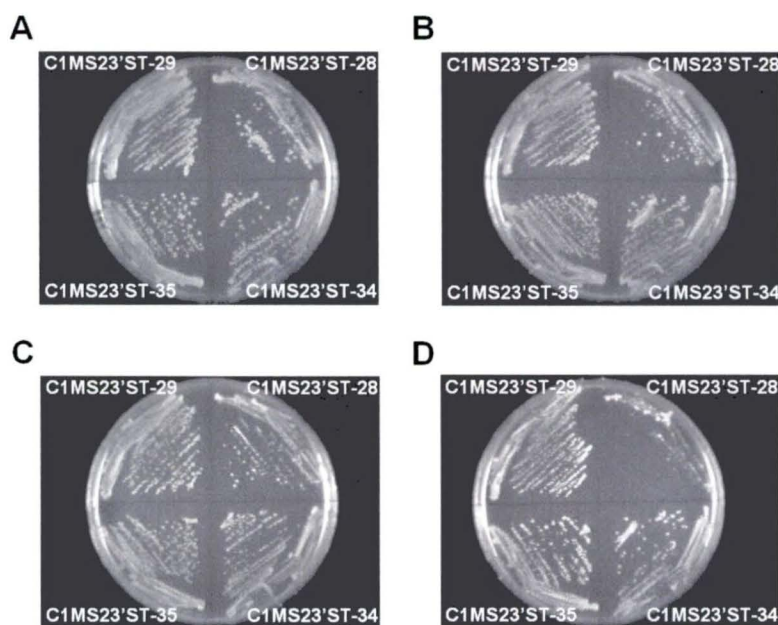


Figure 19. Exemple de clones montrant une interaction avec *TLC1*. Passage des clones C1MS23'ST-28, C1MS23'ST-29, C1MS23'ST-34 et C1MS23'ST-35, après isolation et réintroduction dans la souche, sur milieux sélectifs (A) YC-Trp-Leu-Ura et sur milieux sélectifs YC-Trp-Leu-Ura-His avec (B) 250µM, (C) 500µM et (D) 1mM 3-AT.

Tableau 7. Identité des protéines montrant une interaction avec TLC1.

NOM DU CLONE	IDENTIFICATION	NOM DU CLONE	IDENTIFICATION
C1MS23'ST-28	<i>NTH1</i> -Tréhalase neutre	C1MS23'ST-34	YOR376W
C1MS23'ST-35	<i>LYS2</i>	C3MS23'ST-91	YGL050W
C1MS23'ST-51	<i>AKR2</i> - Fonction inconnue	C3MS23'ST-129	YHR209W
C1MS23'ST-55	<i>NST1</i> - Fonction inconnue	C1MS23'ST-50	Région intergénique
C2MS23'ST-4	<i>KIN82</i> – Protéine kinase sérthréo	C2MS23'ST-6	Région intergénique
C2MS23'ST-45	<i>PRC1</i> - Carboxypeptidase Y vacuolaire	C2MS23'ST-12	Région intergénique
C2MS23'ST-84	<i>GEM1</i> - Transport mitochondrial	C1MS23'ST-62	ADNr
C2MS23'ST-87	<i>ENA2</i> - Pompe à sodium P-type ATPase	C1MS23'ST-85	ADNr
C2MS23'ST-97	<i>PMT2</i> - Protéine-O-mannosyltransférase	C1MS23'ST-89	ADNr
C2MS23'ST-102	<i>HKR1</i> - Prot. de surface sérthréo riche	C3MS23'ST-15	ADNr
C2MS23'ST-104	<i>GOS1</i> - Transport protéine Vsnare golgi	C1MS23'ST-66	Rétrotransposons
C2MS23'ST-106	<i>SPP381</i> - Épissage ARNm nucléaire	C2MS23'ST-31	Sous-région télomérique
C3MS23'ST-26	<i>SCW10</i> - Activité glycosidase	C1MS23'ST-29	Manque d'homologie
C3MS23'ST-90	<i>SOK2</i> - Facteur de transcription	C2MS23'ST-36	Manque d'homologie
C3MS23'ST-111	<i>URA2</i>		

IV. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

IDENTIFICATION DES PARTENAIRES DE YKU PAR DOUBLE-HYBRIDE

Pour chacune des parties du criblage effectué, nous pouvons prétendre avoir couvert la librairie génomique à plus de 95%, puisque le nombre de transformants obtenus pour chacune de ces parties dépasse les 2 580 000 (James, P. *et al.*, 1996). Lors de l'analyse des clones repêchés, il s'est avéré que la majorité de ceux-ci ne montraient qu'une croissance sur milieu sélectif sans histidine. En fait, seulement cinq clones poussaient aussi bien sur milieu sélectif sans histidine que sans adénine. Suite à la réintroduction du plasmide isolé de ces clones, un seul avait toujours une bonne croissance sur milieu sélectif sans histidine. Cependant, ce clone s'est avéré être un faux positif, puisque à lui seul, il permettait aux cellules de croître sur un milieu sélectif sans histidine. Celui-ci aurait donc pu être identifié comme un facteur de transcription, mais ce ne fût pas le cas. Il fût plutôt identifié comme *SDC25*, dont le produit protéique serait impliqué à un certain niveau avec l'activité des protéines Ras. En somme, aucun bon clone n'a été repêché de ce criblage. Afin de résoudre le problème encouru, il aurait été possible de sortir l'insert du vecteur pGAD-C1, afin de le recloner dans un vecteur pGBD. Cette nouvelle construction aurait alors été introduite dans la souche LRY100, afin de

s'assurer que la croissance observée était bien induite par la présence de cette portion du gène *SDC25*, et non pas due à la structure adoptée par la protéine de fusion. Advenant le cas où aucune croissance ne serait observée avec cette nouvelle construction. Il faudrait alors refaire les analyses nécessaires, mais cette fois en utilisant le pGAD-YKU70/80 ou sa construction inverse. Finalement, la seule perspective envisageable pour ce projet consisterait à procéder par co-immunoprécipitation pour identifier des partenaires de Yku, plutôt que par double-hybride.

RÔLE DES SOUS-UNITÉS DU COMPLEXE YKU AUX TÉLOMÈRES

Les résultats ont démontré qu'il serait nécessaire, pour que leurs fonctions télomériques soient accomplies, que les deux sous-unités du complexe Yku soient présentes au même moment aux extrémités chromosomiques. En effet, que ce soit au niveau du TPE, du simple-brin télomérique ou de la longueur des télomères, une sous-unité, à elle seule, ne semble pas apte à exercer les fonctions télomériques répertoriées pour l'hétérodimère. En somme, les résultats obtenus corrélaient avec l'idée générale soulevée tout récemment par (Koike et Koike, 2005) concernant l'hétérodimère humain. Ces chercheurs se sont intéressés au rôle de l'hétérodimérisation de Ku dans les fonctions du complexe et ont soulevé la

même hypothèse que nous à ce sujet : Ku70 et Ku80 pourraient avoir des fonctions indépendantes l'une de l'autre, bien que ces protéines aient toujours été considérées comme formant et fonctionnant en complexe. Les résultats de cet article proposent que l'hétérodimérisation de Ku serait nécessaire pour la stabilisation du complexe dans le cytoplasme et pour sa translocation au noyau (Koike et Koike, 2005; Koike *et al.*, 2001). Préalablement à cette étude, une autre équipe a démontré que l'hétérodimérisation de Ku, ainsi que sa liaison à l'ADN étaient essentielles, mais pour la réparation des cassures double-brin de l'ADN par Ku70 (Jin et Weaver, 1997). De plus, l'étude cristallographique du complexe Ku humain propose que l'hétérodimérisation aurait lieu avant même sa liaison aux télomères et/ou aux extrémités d'ADN double-brin. En fait, les auteurs proposent que l'hétérodimérisation permettrait la liaison du complexe aux extrémités d'ADN (Walker *et al.*, 2001). Il serait alors impossible pour une sous-unité de lier de telles extrémités. Nous nous sommes alors demandés si, chez la levure, l'hétérodimérisation de Yku était nécessaire pour qu'il exerce ses fonctions. Dans cette étude, nous avons démontré que la formation de l'hétérodimère était non seulement requise pour la liaison aux télomères, mais aussi pour l'activation du complexe en lui-même.

Le modèle que nous proposons en complément aux résultats obtenus chez l'humain est le suivant : tout d'abord, les deux sous-unités se lieraient, formant ainsi une structure en anneau. Cet anneau pourrait alors glisser sur

l'ADN au niveau des télomères et/ou des cassures double-brin. Le complexe serait alors en mesure d'exercer ses fonctions. On ne peut cependant pas dire si le complexe est activé lors de sa formation ou s'il ne l'est qu'une fois lié à l'ADN et avec l'interaction des protéines environnantes. Ces questions restent à éclaircir.

Dans cette étude, nous avons étudié l'importance de chacune des sous-unités au niveau du TPE et du maintien de l'intégrité des télomères (simple-brin et longueur) seulement. Bien que les études chez l'humain propose que l'hétérodimérisation de Ku serait nécessaire pour sa fonction au niveau du NHEJ, il serait peut-être intéressant de le vérifier chez la levure, puisque l'étude de Koike et Koike propose que Ku80 aurait une fonction indépendante de Ku70 dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN. Pour ce faire, on doit disposer d'une souche dont les gènes *yku70*, *yku80* sont délétés, et dont l'endonucléase HO est absente, ainsi que d'une construction plasmidique comportant deux sites de liaison à l'ADN UASg en tandem séparé par un site de reconnaissance pour l'endonucléase HO. Ce plasmide est alors introduit dans la souche décrite précédemment, de même que les constructions pGBD-YKU70, pGBD-YKU80, pGBD-YKU70/80 ou pGBD-YKU80/70. Les cellules sont ensuite mise en contact avec l'endonucléase HO, provoquant la linéarisation du plasmide. On observe alors la différence entre le taux de religation lorsque seulement une sous-unité est présente par rapport à celui lorsque les deux sont exprimées dans la cellule. Finalement, il

serait peut-être intéressant d'étudier le rôle de l'hétérodimérisation de Yku dans l'organisation sous-nucléaire des télomères.

IDENTIFICATION DES PARTENAIRES DE L'ARN TLC1 PAR TRIPLE-HYBRIDE

Tout d'abord, nous avons pu observer une croissance sur milieu sélectif, et ce, pour tous les contrôles effectués, soient entre l'ARN TLC1 et les protéines Est1p, Est2p et Yku. Il nous a donc été possible d'observer une interaction, par triple-hybride, entre ces différentes protéines et l'ARN de la télomérase, du moins pour les portions utilisées pour chacun des contrôles. Par la suite, le criblage pour identifier des partenaires d'interaction avec l'ARN de la télomérase, TLC1, a été amorcé en utilisant comme proie la portion 3' de l'ARN. Il nous est possible de prétendre que la librairie génomique utilisée est couverte à plus de 95%, puisque le nombre de transformants obtenus est supérieur à 2 580 000 (James, P. *et al.*, 1996). Les différents clones repêchés, c'est-à-dire 296, ont subi plusieurs étapes de sélection pour être en majeure partie éliminés. Il n'est resté que 25 clones positifs après l'étape cruciale de réintroduction dans la souche initiale. Ces différents clones ont par la suite été séquencés.

Suite au séquençage des clones positifs, les séquences de ces derniers ont été analysées. Premièrement, le respect du cadre de lecture par rapport au gène identifié a été analysé. Il s'est avéré que pour seulement 6 clones séquencés, le cadre de lecture correspondait au même cadre que celui du gène identifié. Par contre, tous ces clones ne représentaient qu'une portion de la protéine exprimée selon la séquence obtenue de l'insert. Nous avons alors converti les séquences d'ADN obtenues des autres clones en acides aminés pour identifier d'autres gènes qui pourraient s'apparenter à ceux identifiés, mais au niveau protéique. Nous avons aussi vérifié la présence de différents motifs ou régions d'homologie au sein des séquences protéiques obtenues suite à la conversion des séquences nucléiques des clones repêchés et aucun motif ou région d'homologie ne semblait commun entre ces clones. Aucun gène identifié par cette analyse ne semblait intéressant, mis à part les quatre ORFs non caractérisés, ainsi que *ARK2*, *NST1* et *SPP381*, dont il sera question plus loin. Il est à noter que chaque clone repêché du criblage correspond à un gène ou région d'ADN différent et qu'on ne retrouve pas les protéines Sm qui auraient dû, en théorie, être repêchées. Par contre, il se peut qu'il nous soit impossible de les obtenir si toutes les protéines formant le complexe doivent être présentes pour qu'il y ait liaison au site Sm de l'ARN. En fait, la majorité des inserts présents dans les plasmides constituant la librairie ne sont que des portions des gènes, les fragments étant de 500 pb à 2-3 kb (James, P. *et al.*, 1996). De plus, il se peut que la conformation protéique adoptée des différentes protéines Sm en fusion avec

le domaine d'activation de la transcription de Gal4p ne permette pas la détection de l'interaction par triple-hybride.

Bien qu'aucune protéine Sm n'ait été repêchée directement de ce criblage, deux candidats semblent intéressants et en lien avec ces protéines. Tout d'abord, *NST1* est un gène encodant pour la protéine Nst1p dont les fonctions sont inconnues. Il a été démontré qu'elle interagissait avec Msl1p et Spp382p, deux protéines impliquées dans l'épissage des ARNm (Hazbun *et al.*, 2003). Un fait important à ne pas négliger est que Spp382p est reconnue pour interagir avec les protéines Sm, Smx2p et Smx3p (Gavin *et al.*, 2002). L'autre candidat repêché, correspondant au gène *SPP381*, encode pour la protéine Spp381p. Cette protéine est associée au tri-snRNP U4/U5.U6, donc elle aussi impliquée dans l'épissage. De plus, cette protéine interagirait avec la protéine Sm, Smb1p (Gavin *et al.*, 2002). Donc pour ces deux candidats, il est possible de faire un lien avec les protéines Sm, et un d'entre eux n'est pas caractérisé, soit *NST1*. Il serait alors intéressant de continuer l'analyse avec ces gènes, ainsi que de *AKR2*, dont les fonctions sont inconnues.

À titre de perspective au projet entamé, il faudra sans aucun doute continuer à effectuer le criblage pour d'autres portions de l'ARN TLC1, et ce, en commençant par la portion connue pour être liée par Est1p. Celle-ci pourrait être liée par d'autres protéines, étant donné sa taille et sa structure. Pour ce criblage, il serait primordial de repêcher, à titre de contrôle, Est1p,

puisque nous avons démontré qu'il était possible de détecter une interaction entre cette protéine et la portion d'ARN qu'elle lie par triple-hybride. Par contre, la région de la protéine interagissant avec l'ARN TLC1 n'ayant pas été déterminée encore, il n'est pas certain que la protéine se retrouve dans la librairie sous forme entière et donc, il pourrait être possible qu'on ne repêche pas Est1p dans le criblage. Par la suite, d'autres parties du criblage global pourront être effectuées dont une avec l'hélice II de la structure de l'ARN TLC1 proposée par (Dandjinou *et al.*, 2004). Cette portion inclut entre autre le site de liaison de Yku. Une autre partie du criblage global pourrait être effectuée avec la portion centrale de l'ARN incluant le site de liaison de Est2p, ainsi que la matrice et la région délimitant la matrice (Dandjinou *et al.*, 2004). Dans le cas où des gènes intéressants seraient repêchés des autres criblages, il sera alors intéressant d'étudier la structure des télomères (longueur et simple-brin télomérique) dans les souches délétées pour ces gènes, ce qui pourra être réalisé au moyen de la collection de délétions détenue par le département (Winzeler *et al.*, 1999). Il sera aussi intéressant de valider les interactions par immunoprécipitation et par triple-hybride, mais en utilisant les protéines entières. De plus, il serait intéressant d'utiliser le système triple-hybride à l'inverse, c'est-à-dire afin d'identifier une région de l'ARN TLC1 où une protéine faisant partie de la télomérase pourrait se lier (Sengupta *et al.*, 1999). Par exemple Est3p, dont les fonctions demeurent toujours obscures. Une autre approche pour identifier des partenaires de l'ARN TLC1 est présentement en cours dans le laboratoire. Elle consiste à

étiqueter l'ARN et à procéder par immunoprécipitation dans un extrait protéique total de levure au moyen d'un anticorps reconnaissant l'étiquette. Il sera alors intéressant de combiner les résultats obtenus des deux méthodes employées et de les valider par la méthode alternative dans chacun des cas. Finalement, puisqu'il nous a été possible de détecter par triple-hybride une interaction entre Est2p et la portion de TLC1 que cette protéine lie, il pourrait être intéressant d'étudier le pseudo-nœud proposé par Dandjinou *et al.*, 2004 entre les hélices V et VI en utilisant une série de constructions comportant des mutations spécifiques. Il sera peut-être alors possible de confirmer la présence de ce pseudo-nœud avec cette méthode.

En somme, les différents projets élaborés dans ce mémoire n'ont pas tous donné les résultats escomptés. Il nous a entre autre été impossible d'identifier des partenaires de l'hétérodimère Yku par double-hybride. Le second projet, quant à lui, nous a permis de déterminer que la formation de l'hétérodimère Yku semble requise pour que ce dernier exerce ses fonctions télomériques. Finalement, au niveau de l'identification de partenaires de l'ARN TLC1 par triple-hybride, trois candidats pourraient s'avérer intéressants, soient *NST1*, *SPP381* et *ARK2*. Or, une analyse plus approfondie de ces derniers sera nécessaire pour en arriver à établir un lien concret entre ces protéines et l'ARN de la télomérase. Puisque le criblage n'en est qu'à ces débuts, il est probable que d'autres candidats seront repêchés dans le futur. En outre, le système triple-hybride pourrait être fort utile pour l'étude du

pseudo-nœud proposé par Dandjinou *et al.*, 2004 entre les hélices V et VI de l'ARN TLC1. À la lumière des résultats obtenus, nous réalisons donc qu'il est important de rester critique en matière de criblages. Des partenaires intéressants peuvent être identifiés par ces méthodes, mais il n'en demeure pas moins qu'il n'y a aucune assurance d'en retrouver.

V. REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier Geneviève pour être la meilleure amie, sœur et colocataire qu'on pourrait souhaiter et pour m'avoir toujours encouragée à persévérer. Je remercie aussi mes parents, Pierre et Sylvie, pour m'avoir supporté et motivé au cours des trois dernières années. Je voudrais aussi remercier mon directeur de recherche, le Dr. Raymund J. Wellinger, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et avoir cru en des projets qui n'ont pas toujours été faciles. Je remercie également tous les membres anciens et présents du laboratoire pour les discussions et l'entraide qui y règne. Un merci spécial à M. Michel Larrivée, pour les constructions et souches, mais surtout pour la formation et les conseils qu'il m'a apportés. Merci aussi à tous les membres du département. Je voudrais remercier ceux m'ayant fourni des plasmides et des souches, soit le Dr. Sherif Abou Elela, le Dr. Gilles Boire, le Dr. Daniel Gottschling, Mme. Stéphanie Larose et M. Michel Larrivée. Finalement, je voudrais remercier le Dr. Brendan Bell et le Dr. Éric Massé pour avoir accepté de constituer mon jury de mémoire.

IV. LISTE DES RÉFÉRENCES

Adams Martin, A., Dionne, I., Wellinger, R. J. et Holm, C. (2000). The function of DNA polymerase alpha at telomeric G tails is important for telomere homeostasis. *Mol Cell Biol* **20**: 786-796.

Bartel, P. L., Roecklein, J. A., SenGupta, D. et Fields, S. (1996). A protein linkage map of Escherichia coli bacteriophage T7. *Nat Genet* **12**: 72-77.

Baudin, A., Ozier-Kalogeropoulos, O., Denouel, A., Lacroute, F. et Cullin, C. (1993). A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **21**: 3329-3330.

Bilaud, T., Brun, C., Ancelin, K., Koering, C. E., Laroche, T. et Gilson, E. (1997). Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat Genet* **17**: 236-239.

Blackburn, E. H. et Challoner, P. B. (1984). Identification of a telomeric DNA sequence in *Trypanosoma brucei*. *Cell* **36**: 447-457.

Blackburn, E. H. et Gall, J. G. (1978). A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol* **120**: 33-53.

Blasco, M. A., Lee, H. W., Hande, M. P., Samper, E., Lansdorp, P. M., DePinho, R. A. et Greider, C. W. (1997). Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA [see comments]. *Cell* **91**: 25-34.

Blier, P. R., Griffith, A. J., Craft, J. et Hardin, J. A. (1993). Binding of Ku protein to DNA. Measurement of affinity for ends and demonstration of binding to nicks. *J Biol Chem* **268**: 7594-7601.

Bloom, K. S. et Carbon, J. (1982). Yeast centromere DNA is in a unique and highly ordered structure in chromosomes and small circular minichromosomes. *Cell* **29**: 305-317.

Boeke, J. D., Trueheart, J., Natsoulis, G. et Fink, G. R. (1987). 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol* **154**: 164-175.

Bordonne, R. (2000). Functional characterization of nuclear localization signals in yeast Sm proteins. *Mol Cell Biol* **20**: 7943-7954.

Boulton, S. J. et Jackson, S. P. (1996a). Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. *Nucleic Acids Res* **24**: 4639-4648.

Boulton, S. J. et Jackson, S. P. (1996b). *Saccharomyces cerevisiae* Ku70 potentiates illegitimate DNA double-strand break repair and serves as a barrier to error-prone DNA repair pathways. *Embo J* **15**: 5093-5103.

Boulton, S. J. et Jackson, S. P. (1998). Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *Embo J* **17**: 1819-1828.

Bourns, B. D., Alexander, M. K., Smith, A. M. et Zakian, V. A. (1998). Sir proteins, Rif proteins, and Cdc13p bind *Saccharomyces* telomeres in vivo. *Mol Cell Biol* **18**: 5600-5608.

Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P. et Boeke, J. D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**: 115-132.

Braunstein, M., Rose, A. B., Holmes, S. G., Allis, C. D. et Broach, J. R. (1993). Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. *Genes Dev* **7**: 592-604.

Broccoli, D., Smogorzewska, A., Chong, L. et de Lange, T. (1997). Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet* **17**: 231-235.

Bryk, M., Banerjee, M., Murphy, M., Knudsen, K. E., Garfinkel, D. J. et Curcio, M. J. (1997). Transcriptional silencing of Ty1 elements in the RDN1 locus of yeast. *Genes Dev* **11**: 255-269.

Buchman, A. R., Lue, N. F. et Kornberg, R. D. (1988). Connections between transcriptional activators, silencers, and telomeres as revealed by functional analysis of a yeast DNA-binding protein. *Mol Cell Biol* **8**: 5086-5099.

Cano, M. I., Dungan, J. M., Agabian, N. et Blackburn, E. H. (1999). Telomerase in kinetoplastid parasitic protozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 3616-3621.

Carmen, A. A., Milne, L. et Grunstein, M. (2002). Acetylation of the yeast histone H4 N terminus regulates its binding to heterochromatin protein SIR3. *J Biol Chem* **277**: 4778-4781.

Chan, C. S. et Tye, B. K. (1983a). A family of *Saccharomyces cerevisiae* repetitive autonomously replicating sequences that have very similar genomic environments. *J Mol Biol* **168**: 505-523.

Chan, C. S. et Tye, B. K. (1983b). Organization of DNA sequences and replication origins at yeast telomeres. *Cell* **33**: 563-573.

Chandra, A., Hughes, T. R., Nugent, C. I. et Lundblad, V. (2001). Cdc13 both positively and negatively regulates telomere replication. *Genes Dev* **15**: 404-414.

Chang, J. F., Hall, B. E., Tanny, J. C., Moazed, D., Filman, D. et Ellenberger, T. (2003). Structure of the coiled-coil dimerization motif of Sir4 and its interaction with Sir3. *Structure (Camb)* **11**: 637-649.

Chapon, C., Cech, T. R. et Zaug, A. J. (1997). Polyadenylation of telomerase RNA in budding yeast. *Rna* **3**: 1337-1351.

Chappell, A. S. et Lundblad, V. (2004). Structural elements required for association of the *Saccharomyces cerevisiae* telomerase RNA with the Est2 reverse transcriptase. *Mol Cell Biol* **24**: 7720-7736.

Chen, J. L., Blasco, M. A. et Greider, C. W. (2000). Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell* **100**: 503-514.

Chien, C. T., Bartel, P. L., Sternglanz, R. et Fields, S. (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 9578-9582.

Chong, L., van Steensel, B., Broccoli, D., Erdjument-Bromage, H., Hanish, J., Tempst, P. et de Lange, T. (1995). A human telomeric protein. *Science* **270**: 1663-1667.

Cohn, M. et Blackburn, E. H. (1995). Telomerase in yeast. *Science* **269**: 396-400.

Conrad, M. N., Wright, J. H., Wolf, A. J. et Zakian, V. A. (1990). RAP1 protein interacts with yeast telomeres in vivo: overproduction alters telomere structure and decreases chromosome stability. *Cell* **63**: 739-750.

Counter, C. M., Avilion, A. A., LeFeuvre, C. E., Stewart, N. G., Greider, C. W., Harley, C. B. et Bacchetti, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *Embo J* **11**: 1921-1929.

Cuperus, G., Shafaatian, R. et Shore, D. (2000). Locus specificity determinants in the multifunctional yeast silencing protein Sir2. *Embo J* **19**: 2641-2651.

D'Amours, D. et Jackson, S. P. (2002). The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 317-327.

Dandjinou, A. T., Levesque, N., Larose, S., Lucier, J. F., Abou Elela, S. et Wellinger, R. J. (2004). A phylogenetically based secondary structure for the yeast telomerase RNA. *Curr Biol* **14**: 1148-1158.

Diede, S. J. et Gottschling, D. E. (1999). Telomerase-mediated telomere addition in vivo requires DNA primase and DNA polymerases alpha and delta. *Cell* **99**: 723-733.

Diede, S. J. et Gottschling, D. E. (2001). Exonuclease activity is required for sequence addition and Cdc13p loading at a de novo telomere. *Curr Biol* **11**: 1336-1340.

Dionne, I. et Wellinger, R. J. (1996). Cell cycle-regulated generation of single-stranded G-rich DNA in the absence of telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 13902-13907.

Driller, L., Wellinger, R. J., Larrivee, M., Kremmer, E., Jaklin, S. et Feldmann, H. M. (2000). A short C-terminal domain of Yku70p is essential for telomere maintenance. *J Biol Chem* **275**: 24921-24927.

Dunn, B., Szauter, P., Pardue, M. L. et Szostak, J. W. (1984). Transfer of yeast telomeres to linear plasmids by recombination. *Cell* **39**: 191-201.

Evans, S. K. et Lundblad, V. (1999). Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access. *Science* **286**: 117-120.

Evans, S. K. et Lundblad, V. (2002). The Est1 subunit of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase makes multiple contributions to telomere length maintenance. *Genetics* **162**: 1101-1115.

Feinberg, A. P. et Vogelstein, B. (1984). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal Biochem* **137**: 266-267.

Feldmann, H., Driller, L., Meier, B., Mages, G., Kellermann, J. et Winnacker, E. L. (1996). HDF2, the second subunit of the Ku homologue from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **271**: 27765-27769.

- Feldmann, H. et Winnacker, E. L.** (1993). A putative homologue of the human autoantigen Ku from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **268**: 12895-12900.
- Feng, J., Funk, W. D., Wang, S. S., Weinrich, S. L., Avillion, A. A., Chiu, C. P., Adams, R. R., Chang, E., Allsopp, R. C., Yu, J. et al.** (1995). The RNA component of human telomerase. *Science* **269**: 1236-1241.
- Ferrezuelo, F., Steiner, B., Aldea, M. et Futcher, B.** (2002). Biogenesis of yeast telomerase depends on the importin mtr10. *Mol Cell Biol* **22**: 6046-6055.
- Fields, S. et Song, O.** (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-246.
- Friedberg, E. C., Walker, G. C. et Siede, W.** (1995). *DNA Repair and Mutagenesis*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Garvik, B., Carson, M. et Hartwell, L.** (1995). Single-stranded DNA arising at telomeres in *cdc13* mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint. *Mol Cell Biol* **15**: 6128-6138.
- Gavin, A. C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A. M., Cruciat, C. M. et al.** (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**: 141-147.
- Gietz, R. D. et Woods, R. A.** (2005). Yeast Transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG Method. *Methods Mol Biol* **313**: 107-120.
- Good, P. D. et Engelke, D. R.** (1994). Yeast expression vectors using RNA polymerase III promoters. *Gene* **151**: 209-214.
- Gotta, M., Laroche, T., Formenton, A., Maillet, L., Scherthan, H. et Gasser, S. M.** (1996). The clustering of telomeres and colocalization with Rap1, Sir3, and Sir4 proteins in wild-type *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **134**: 1349-1363.
- Gottlieb, T. M. et Jackson, S. P.** (1993). The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* **72**: 131-142.
- Gottschling, D. E., Aparicio, O. M., Billington, B. L. et Zakian, V. A.** (1990). Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell* **63**: 751-762.

Grandin, N., Damon, C. et Charbonneau, M. (2001). Ten1 functions in telomere end protection and length regulation in association with Stn1 and Cdc13. *Embo J* **20**: 1173-1183.

Grandin, N., Reed, S. I. et Charbonneau, M. (1997). Stn1, a new *Saccharomyces cerevisiae* protein, is implicated in telomere size regulation in association with Cdc13. *Genes Dev* **11**: 512-527.

Gravel, S., Larrivee, M., Labrecque, P. et Wellinger, R. J. (1998). Yeast Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure. *Science* **280**: 741-744.

Greider, C. W. et Blackburn, E. H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* **43**: 405-413.

Greider, C. W. et Blackburn, E. H. (1987). The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* **51**: 887-898.

Grewal, S. I. et Elgin, S. C. (2002). Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. *Curr Opin Genet Dev* **12**: 178-187.

Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H. et de Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **97**: 503-514.

Grunstein, M. et Hogness, D. S. (1975). Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**: 3961-3965.

Haber, J. E. (1998). The many interfaces of Mre11. *Cell* **95**: 583-586.

Hazbun, T. R., Malmstrom, L., Anderson, S., Graczyk, B. J., Fox, B., Riffle, M., Sundin, B. A., Aranda, J. D., McDonald, W. H., Chiu, C. H. et al. (2003). Assigning function to yeast proteins by integration of technologies. *Mol Cell* **12**: 1353-1365.

Hecht, A., Laroche, T., Strahl-Bolsinger, S., Gasser, S. M. et Grunstein, M. (1995). Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell* **80**: 583-592.

Hecht, A., Strahl-Bolsinger, S. et Grunstein, M. (1996). Spreading of transcriptional repressor SIR3 from telomeric heterochromatin. *Nature* **383**: 92-96.

Henderson, E. (1995). Telomere DNA structure, pp. 11-34. Dans *Telomeres*, (eds E. H. Blackburn et C. W. Greider). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Hengen, P. N. (1995). Methods and reagents. Electro-transformation of *Escherichia coli* with plasmid DNA. *Trends Biochem Sci* **20**: 248-249.

Herskowitz, I., Rine, J. et Strathern, J. (1992). Mating-type determination and mating-type interconversion in *Saccharomyces cerevisiae*, pp. 583-656. Dans *The molecular biology of the yeast Saccharomyces*, vol. 2 (ed. E. W. Jones, Pringle J.R. et Broach, J.R.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Hoppe, G. J., Tanny, J. C., Rudner, A. D., Gerber, S. A., Danaie, S., Gygi, S. P. et Moazed, D. (2002). Steps in assembly of silent chromatin in yeast: Sir3-independent binding of a Sir2/Sir4 complex to silencers and role for Sir2-dependent deacetylation. *Mol Cell Biol* **22**: 4167-4180.

Imai, S., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M. et Guarente, L. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **403**: 795-800.

James, B. D., Olsen, G. J. et Pace, N. R. (1989). Phylogenetic comparative analysis of RNA secondary structure. *Methods Enzymol* **180**: 227-239.

James, P., Halladay, J. et Craig, E. A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**: 1425-1436.

Jenuwein, T. et Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science* **293**: 1074-1080.

Jin, S. et Weaver, D. T. (1997). Double-strand break repair by Ku70 requires heterodimerization with Ku80 and DNA binding functions. *Embo J* **16**: 6874-6885.

Johnson, L. M., Fisher-Adams, G. et Grunstein, M. (1992). Identification of a non-basic domain in the histone H4 N-terminus required for repression of the yeast silent mating loci. *Embo J* **11**: 2201-2209.

Johnson, L. M., Kayne, P. S., Kahn, E. S. et Grunstein, M. (1990). Genetic evidence for an interaction between SIR3 and histone H4 in the repression of the silent mating loci in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 6286-6290.

Karpen, G. H. et Allshire, R. C. (1997). The case for epigenetic effects on centromere identity and function. *Trends Genet* **13**: 489-496.

Kayne, P. S., Kim, U. J., Han, M., Mullen, J. R., Yoshizaki, F. et Grunstein, M. (1988). Extremely conserved histone H4 N terminus is dispensable for growth but essential for repressing the silent mating loci in yeast. *Cell* **55**: 27-39.

Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L. et Shay, J. W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266**: 2011-2015.

Kironmai, K. M. et Muniyappa, K. (1997). Alteration of telomeric sequences and senescence caused by mutations in RAD50 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* **2**: 443-455.

Klobutcher, L. A., Swanton, M. T., Donini, P. et Prescott, D. M. (1981). All gene-sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 3015-3019.

Koike, M. et Koike, A. (2005). The Ku70-binding site of Ku80 is required for the stabilization of Ku70 in the cytoplasm, for the nuclear translocation of Ku80, and for Ku80-dependent DNA repair. *Exp Cell Res* **305**: 266-276.

Koike, M., Shiomi, T. et Koike, A. (2001). Dimerization and nuclear localization of ku proteins. *J Biol Chem* **276**: 11167-11173.

Landry, J., Sutton, A., Tafrov, S. T., Heller, R. C., Stebbins, J., Pillus, L. et Sternglanz, R. (2000). The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 5807-5811.

Laroche, T., Martin, S. G., Gotta, M., Gorham, H. C., Pryde, F. E., Louis, E. J. et Gasser, S. M. (1998). Mutation of yeast Ku genes disrupts the subnuclear organization of telomeres. *Curr Biol* **8**: 653-656.

Larrivee, M., LeBel, C. et Wellinger, R. J. (2004). The generation of proper constitutive G-tails on yeast telomeres is dependent on the MRX complex. *Genes Dev* **18**: 1391-1396.

Le, S., Moore, J. K., Haber, J. E. et Greider, C. W. (1999). RAD50 and RAD51 define two pathways that collaborate to maintain telomeres in the absence of telomerase. *Genetics* **152**: 143-152.

- Lendvay, T. S., Morris, D. K., Sah, J., Balasubramanian, B. et Lundblad, V.** (1996). Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional EST genes. *Genetics* **144**: 1399-1412.
- Lin, J., Ly, H., Hussain, A., Abraham, M., Pearl, S., Tzfati, Y., Parslow, T. G. et Blackburn, E. H.** (2004). A universal telomerase RNA core structure includes structured motifs required for binding the telomerase reverse transcriptase protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 14713-14718.
- Lin, J. J. et Zakian, V. A.** (1996). The *Saccharomyces* CDC13 protein is a single-strand TG1-3 telomeric DNA-binding protein in vitro that affects telomere behavior in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 13760-13765.
- Lingner, J. et Cech, T. R.** (1996). Purification of telomerase from *Euplotes aediculatus*: requirement of a primer 3' overhang. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 10712-10717.
- Livengood, A. J., Zaug, A. J. et Cech, T. R.** (2002). Essential regions of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase RNA: separate elements for Est1p and Est2p interaction. *Mol Cell Biol* **22**: 2366-2374.
- Louis, E. J. et Haber, J. E.** (1990). The subtelomeric Y' repeat family in *Saccharomyces cerevisiae*: an experimental system for repeated sequence evolution. *Genetics* **124**: 533-545.
- Louis, E. J. et Haber, J. E.** (1992). The structure and evolution of subtelomeric Y' repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **131**: 559-574.
- Lührmann, R., Kastner, B. et Bach, M.** (1990). Structure of spliceosomal snRNPs and their role in pre-mRNA splicing. *Biochem Biophys Acta* **1087**: 256-292.
- Lundblad, V. et Blackburn, E. H.** (1993). An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence. *Cell* **73**: 347-360.
- Lundblad, V. et Szostak, J. W.** (1989). A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* **57**: 633-643.
- Makarov, V. L., Hirose, Y. et Langmore, J. P.** (1997). Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* **88**: 657-666.
- Marcand, S., Gilson, E. et Shore, D.** (1997a). A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. *Science* **275**: 986-990.

Marcand, S., Wotton, D., Gilson, E. et Shore, D. (1997b). Rap1p and telomere length regulation in yeast. *Ciba Found Symp* **211**: 76-93; discussion 93-103.

Mattaj, I. W. (1986). Cap trimethylation of U snRNA is cytoplasmic and dependent on U snRNP protein binding. *Cell* **46**: 905-911.

Mattaj, I. W. (1988). UsnRNP assembly and transport, pp. 303-357. Dans *Structure and function of the major and minor small nuclear ribonucleoprotein particles*, (ed. M. L. Birnstiel). Springer Verlag, Berlin.

McClintock, B. (1939). The behavior in successive nuclear divisions of a chromosome broken at meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **25**: 405-416.

McClintock, B. (1941). The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* **26**: 234-282.

McElligott, R. et Wellinger, R. J. (1997). The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *Embo J* **16**: 3705-3714.

Megee, P. C., Morgan, B. A., Mittman, B. A. et Smith, M. M. (1990). Genetic analysis of histone H4: essential role of lysines subject to reversible acetylation. *Science* **247**: 841-845.

Meyerson, M., Counter, C. M., Eaton, E. N., Ellisen, L. W., Steiner, P., Caddle, S. D., Ziaugra, L., Beijersbergen, R. L., Davidoff, M. J., Liu, Q. et al. (1997). hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* **90**: 785-795.

Miller, M. C. et Collins, K. (2002). Telomerase recognizes its template by using an adjacent RNA motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 6585-6590.

Milne, G. T., Jin, S., Shannon, K. B. et Weaver, D. T. (1996). Mutations in two Ku homologs define a DNA end-joining repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16**: 4189-4198.

Mimori, T., Akizuki, M., Yamagata, H., Inada, S., Yoshida, S. et Homma, M. (1981). Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. *J Clin Invest* **68**: 611-620.

Mitchell, J. R., Wood, E. et Collins, K. (1999). A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* **402**: 551-555.

Moazed, D. et Johnson, D. (1996). A deubiquitinating enzyme interacts with SIR4 and regulates silencing in *S. cerevisiae*. *Cell* **86**: 667-677.

Moazed, D., Kistler, A., Axelrod, A., Rine, J. et Johnson, A. D. (1997). Silent information regulator protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*: a SIR2/SIR4 complex and evidence for a regulatory domain in SIR4 that inhibits its interaction with SIR3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 2186-2191.

Moazed, D., Rudner, A. D., Huang, J., Hoppe, G. J. et Tanny, J. C. (2004). A model for step-wise assembly of heterochromatin in yeast. *Novartis Found Symp* **259**: 48-56; discussion 56-62, 163-169.

Moretti, P., Freeman, K., Coodly, L. et Shore, D. (1994). Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1. *Genes Dev* **8**: 2257-2269.

Moretti, P. et Shore, D. (2001). Multiple interactions in Sir protein recruitment by Rap1p at silencers and telomeres in yeast. *Mol Cell Biol* **21**: 8082-8094.

Morin, G. B. (1989). The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* **59**: 521-529.

Moyzis, R. K., Buckingham, J. M., Cram, L. S., Dani, M., Deaven, L. L., Jones, M. D., Meyne, J., Ratliff, R. L. et Wu, J. R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 6622-6626.

Muller, H. J. (1938). The remaking of chromosomes. *The Collecting Net* **13**: 181-195, 198.

Murphy, G. A., Spedale, E. J., Powell, S. T., Pillus, L., Schultz, S. C. et Chen, L. (2003). The Sir4 C-terminal coiled coil is required for telomeric and mating type silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* **334**: 769-780.

Nakamura, T. M., Morin, G. B., Chapman, K. B., Weinrich, S. L., Andrews, W. H., Lingner, J., Harley, C. B. et Cech, T. R. (1997). Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* **277**: 955-959.

Nugent, C. I., Bosco, G., Ross, L. O., Evans, S. K., Salinger, A. P., Moore, J. K., Haber, J. E. et Lundblad, V. (1998). Telomere maintenance is dependent on activities required for end repair of double-strand breaks. *Curr Biol* **8**: 657-660.

Nugent, C. I., Hughes, T. R., Lue, N. F. et Lundblad, V. (1996). Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science* **274**: 249-252.

Pace, N. R., Smith, D. K., Olsen, G. J. et James, B. D. (1989). Phylogenetic comparative analysis and the secondary structure of ribonuclease P RNA--a review. *Gene* **82**: 65-75.

Paillard, S. et Strauss, F. (1991). Analysis of the mechanism of interaction of simian Ku protein with DNA. *Nucleic Acids Res* **19**: 5619-5624.

Pennock, E., Buckley, K. et Lundblad, V. (2001). Cdc13 Delivers Separate Complexes to the Telomere for End Protection and Replication. *Cell* **104**: 387-396.

Peterson, S. E., Stellwagen, A. E., Diede, S. J., Singer, M. S., Haimberger, Z. W., Johnson, C. O., Tzoneva, M. et Gottschling, D. E. (2001). The function of a stem-loop in telomerase RNA is linked to the DNA repair protein Ku. *Nat Genet* **27**: 64-67.

Plessel, G., Fischer, U. et Luhrmann, R. (1994). m3G cap hypermethylation of U1 small nuclear ribonucleoprotein (snRNP) in vitro: evidence that the U1 small nuclear RNA-(guanosine-N2)-methyltransferase is a non-snRNP cytoplasmic protein that requires a binding site on the Sm core domain. *Mol Cell Biol* **14**: 4160-4172.

Porter, S. E., Greenwell, P. W., Ritchie, K. B. et Petes, T. D. (1996). The DNA-binding protein Hdf1p (a putative Ku homologue) is required for maintaining normal telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **24**: 582-585.

Potter, P. M. (1996). Directional PCR cloning of multiple repeat sequences. *Biotechniques* **21**: 198, 200.

Pryde, F. E., Gorham, H. C. et Louis, E. J. (1997). Chromosome ends: all the same under their caps. *Curr Opin Genet Dev* **7**: 822-828.

Raghuraman, M. K., Winzeler, E. A., Collingwood, D., Hunt, S., Wodicka, L., Conway, A., Lockhart, D. J., Davis, R. W., Brewer, B. J. et Fangman, W. L. (2001). Replication dynamics of the yeast genome. *Science* **294**: 115-121.

Ray, A. et Runge, K. W. (1998). The C terminus of the major yeast telomere binding protein Rap1p enhances telomere formation. *Mol Cell Biol* **18**: 1284-1295.

Ray, A. et Runge, K. W. (1999). Varying the number of telomere-bound proteins does not alter telomere length in tel1Delta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 15044-15049.

Reynolds, A. E., McCarroll, R. M., Newlon, C. S. et Fangman, W. L. (1989). Time of replication of ARS elements along yeast chromosome III. *Mol Cell Biol* **9**: 4488-4494.

Richards, E. J. et Ausubel, F. M. (1988). Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **53**: 127-136.

Richards, E. J. et Elgin, S. C. (2002). Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* **108**: 489-500.

Richmond, T. J. et Widom, J. (2000). Nucleosome and chromatin structure, pp. 1-23. Dans *Chromatin structure and gene expression*, 2nd ed., (eds S. C. R. Elgin et J. L. Workman). Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.

Rose, M. D., Winston, F. et Hieter, P. (1990). *Methods in yeast genetics; a laboratory course manual*, éd. Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Roy, R., Meier, B., McAinsh, A. D., Feldmann, H. M. et Jackson, S. P. (2004). Separation-of-function mutants of yeast Ku80 reveal a Yku80p-Sir4p interaction involved in telomeric silencing. *J Biol Chem* **279**: 86-94.

Rusche, L. N., Kirchmaier, A. L. et Rine, J. (2003). The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Biochem* **72**: 481-516.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. et Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ième éd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sandell, L. L. et Zakian, V. A. (1993). Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell* **75**: 729-739.

Schar, P., Herrmann, G., Daly, G. et Lindahl, T. (1997). A newly identified DNA ligase of *Saccharomyces cerevisiae* involved in RAD52-independent repair of DNA double-strand breaks. *Genes Dev* **11**: 1912-1924.

Sengupta, D. J., Wickens, M. et Fields, S. (1999). Identification of RNAs that bind to a specific protein using the yeast three-hybrid system. *Rna* **5**: 596-601.

SenGupta, D. J., Zhang, B., Kraemer, B., Pochart, P., Fields, S. et Wickens, M. (1996). A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 8496-8501.

Seto, A. G., Livengood, A. J., Tzfati, Y., Blackburn, E. H. et Cech, T. R. (2002). A bulged stem tethers Est1p to telomerase RNA in budding yeast. *Genes Dev* **16**: 2800-2812.

Seto, A. G., Zaug, A. J., Sobel, S. G., Wolin, S. L. et Cech, T. R. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* telomerase is an Sm small nuclear ribonucleoprotein particle [published erratum appears in *Nature* 1999 Dec 23-30;402(6764):898]. *Nature* **401**: 177-180.

Shampay, J., Szostak, J. W. et Blackburn, E. H. (1984). DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature* **310**: 154-157.

Shay, J. W. et Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* **33**: 787-791.

Singer, M. S. et Gottschling, D. E. (1994). TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* **266**: 404-409.

Smith, J. S. et Boeke, J. D. (1997). An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. *Genes Dev* **11**: 241-254.

Smogorzewska, A. et de Lange, T. (2004). Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu Rev Biochem* **73**: 177-208.

Snow, B. E., Erdmann, N., Cruickshank, J., Goldman, H., Gill, R. M., Robinson, M. O. et Harrington, L. (2003). Functional conservation of the telomerase protein Est1p in humans. *Curr Biol* **13**: 698-704.

Stellwagen, A. E., Haimberger, Z. W., Veatch, J. R., Gottschling, D. E., Peterson, S. E., Diede, S. J., Singer, M. S., Johnson, C. O. et Tzoneva, M. (2003). Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends
The function of a stem-loop in telomerase RNA is linked to the DNA repair protein Ku. *Genes Dev* **17**: 2384-2395.

Strahl-Bolsinger, S., Hecht, A., Luo, K. et Grunstein, M. (1997). SIR2 and SIR4 interactions differ in core and extended telomeric heterochromatin in yeast. *Genes Dev* **11**: 83-93.

Sugawara, N. et Szostak, J. W. (1986). Telomeres of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast (Suppl.)* **1**: 373.

Szutorisz, H., Lingner, J., Cuthbert, A. P., Trott, D. A., Newbold, R. F. et Nabholz, M. (2003). A chromosome 3-encoded repressor of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene controls the state of hTERT chromatin. *Cancer Res* **63**: 689-695.

Taggart, A. K., Teng, S. C. et Zakian, V. A. (2002). Est1p as a cell cycle-regulated activator of telomere-bound telomerase. *Science* **297**: 1023-1026.

Teixeira, M. T., Forstemann, K., Gasser, S. M. et Lingner, J. (2002). Intracellular trafficking of yeast telomerase components. *EMBO Rep* **3**: 652-659.

Teng, S. C., Chang, J., McCowan, B. et Zakian, V. A. (2000). Telomerase-Independent Lengthening of Yeast Telomeres Occurs by an Abrupt Rad50p-Dependent, Rif-Inhibited Recombinational Process. *Mol Cell* **6**: 947-952.

Teng, S. C. et Zakian, V. A. (1999). Telomere-telomere recombination is an efficient bypass pathway for telomere maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 8083-8093.

Tsukamoto, Y., Kato, J. et Ikeda, H. (1997). Silencing factors participate in DNA repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae* [see comments]. *Nature* **388**: 900-903.

Tzfati, Y., Fulton, T. B., Roy, J. et Blackburn, E. H. (2000). Template boundary in a yeast telomerase specified by RNA structure. *Science* **288**: 863-867.

Van der Ploeg, L. H., Liu, A. Y. et Borst, P. (1984). Structure of the growing telomeres of *Trypanosomes*. *Cell* **36**: 459-468.

van Steensel, B., Smogorzewska, A. et de Lange, T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* **92**: 401-413.

Walker, J. R., Corpina, R. A. et Goldberg, J. (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* **412**: 607-614.

Walmsley, R. W., Chan, C. S., Tye, B. K. et Petes, T. D. (1984). Unusual DNA sequences associated with the ends of yeast chromosomes. *Nature* **310**: 157-160.

Wellinger, R. J., Ethier, K., Labrecque, P. et Zakian, V. A. (1996). Evidence for a new step in telomere maintenance. *Cell* **85**: 423-433.

Wellinger, R. J., Wolf, A. J. et Zakian, V. A. (1993a). Origin activation and formation of single-strand TG1-3 tails occur sequentially in late S phase on a yeast linear plasmid. *Mol Cell Biol* **13**: 4057-4065.

Wellinger, R. J., Wolf, A. J. et Zakian, V. A. (1993b). Saccharomyces telomeres acquire single-strand TG1-3 tails late in S phase. *Cell* **72**: 51-60.

Will, C. L. et Luhrmann, R. (2001). Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol* **13**: 290-301.

Winzeler, E. A., Shoemaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J. D., Bussey, H. et al. (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* **285**: 901-906.

Wright, J. H., Gottschling, D. E. et Zakian, V. A. (1992). Saccharomyces telomeres assume a non-nucleosomal chromatin structure. *Genes Dev* **6**: 197-210.

Wright, W. E., Tesmer, V. M., Huffman, K. E., Levene, S. D. et Shay, J. W. (1997). Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev* **11**: 2801-2809.

Zakian, V. A. (1989). Structure and function of telomeres. *Annu Rev Genet* **23**: 579-604.

Zakian, V. A. (1995). Telomeres: beginning to understand the end. *Science* **270**: 1601-1607.

Zakian, V. A. (1996). Telomere functions: lessons from yeast. *Trends Cell Biol* **6**: 29-33.

Zakian, V. A. et Blanton, H. M. (1988). Distribution of telomere-associated sequences on natural chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **8**: 2257-2260.

Zappulla, D. C. et Cech, T. R. (2004). Yeast telomerase RNA: a flexible scaffold for protein subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 10024-10029.

Zaug, A. J. et Cech, T. R. (1995). Analysis of the structure of *Tetrahymena* nuclear RNAs in vivo: telomerase RNA, the self-splicing rRNA intron, and U2 snRNA. *Rna* **1**: 363-374.